

ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE ESTÁ AUMENTADA NA SÍNDROME HEPATOPULMONAR EM RATOS

Myeloperoxidase activity is increased in hepatopulmonary syndrome in rats

Lucas Souto **NACIF**, Wellington **ANDRAUS**, Márcia Saldanha **KUBRUSLY**,
Nilza **MOLAN**, Eleazar **CHAIB**, Luiz Augusto Carneiro **D'ALBUQUERQUE**

Trabalho realizado na Disciplina de Transplante de Órgãos do Aparelho Digestivo – Laboratório de Investigações Médicas (LIM 37), Departamento de Gastroenterologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

DESCRITORES - Síndrome hepatopulmonar. Modelo animal, experimental. Atividade da mieloperoxidase

Correspondência:

Lucas Souto Nacif
E-mail: lucasnacif@usp.br

Fonte de financiamento: não há
Conflito de interesses: não há

Recebido para publicação: 19/03/2013
Aceito para publicação: 23/07/2013

HEADINGS - Hepatopulmonary syndrome. Animal model, experimental. Myeloperoxidase activity.

RESUMO - Racional: A síndrome hepatopulmonar é formada por tríade clínica composta de doença hepática, dilatação vascular intrapulmonar e alterações de gases sanguíneos. Sua patogênese não é bem definida, mas especula-se que uma combinação de fatores, tais como o desequilíbrio das respostas dos receptores de endotelina, remodelação microvascular pulmonar e predisposição genética, leva à translocação bacteriana e dilatação vascular intrapulmonar. **Objetivo:** Avaliar a atividade da mieloperoxidase em modelo experimental de síndrome hepatopulmonar em ratos. **Método:** Foram estudados 29 animais divididos em grupos controle, sham e experimental de síndrome hepatopulmonar. O modelo experimental utilizado para induzir a síndrome foi a ligadura de ducto biliar comum. **Resultados:** Os níveis de mieloperoxidase foram significativamente maiores no grupo ligadura de ducto biliar comum em comparação com os outros grupos. A atividade da mieloperoxidase foi maior no grupo ligadura de ducto biliar comum que o grupo controle ($p < 0,05$) e do grupo sham ($p < 0,05$). **Conclusão:** A atividade da mieloperoxidase estava aumentada na síndrome hepatopulmonar experimentais em ratos.

ABSTRACT - Background: Hepatopulmonary syndrome is formed by a triad of liver disease, intrapulmonary vascular dilatation and changes in blood gases. Its pathogenesis is not well defined, but it is speculated that a combination of factors, such as the imbalance of endothelin receptor responses, pulmonary microvascular remodeling, and genetic predisposition, leads to bacterial translocation and intrapulmonary vascular dilatation. **Aim:** To evaluate the myeloperoxidase activity in hepatopulmonary syndrome in rat model. **Method:** Twenty-nine rats were divided into control, sham and experimental hepatopulmonary syndrome groups. Was evaluated the myeloperoxidase activity and the experimental model used to induce hepatopulmonary syndrome was common bile duct ligation. **Results:** The myeloperoxidase activity levels were significantly increased in the common bile duct ligation group as compared with the other groups. Myeloperoxidase activity was higher in the common bile duct ligation group than control group ($p < 0.05$) and than sham group ($p < 0.05$). **Conclusion:** The myeloperoxidase activity is increased in experimental hepatopulmonary syndrome in rats.

INTRODUÇÃO

Síndrome hepatopulmonar (SHP) é formada pela entidade clínica composta por uma tríade: doença hepática crônica, dilatação vascular intrapulmonar e alteração nos gases arteriais. Esta condição está presente em 4% a 32% dos pacientes com cirrose. A sua fisiopatogênese não está bem definida, mas especula-se uma combinação de fatores, tais como o desequilíbrio na resposta dos receptores de endotelina, a remodelação microvascular pulmonar e predisposição genética, levando à dilatação vascular intrapulmonar e translocação bacteriana^{1,4,5,8}.

As características fisiopatológicas vem sendo estudadas a partir do modelo estabelecido de SHP experimental, induzida pela CBDL. São relatadas

alterações da microvasculatura pulmonar, incluindo a vasodilatação, o acúmulo de monócitos intravascular e angiogênese^{1,4,8,9}. Alguns autores demonstraram que o aumento na expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) nos pulmões dos animais operados (CBDL) pode também contribuir para a produção local de óxido nítrico durante a progressão da SHP^{1,4,7,8}.

A fisiopatologia da entidade não é completamente compreendida, de modo que o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade da mieloperoxidase (MPO) no modelo de SHP em ratos.

MÉTODOS

Animais

Ratos Wistar machos (200-250 g, LIM 37/USP, São Paulo, Brasil) foram alojados em 19°C±3°C, com um ciclo de 12 h (6:00-18:00 horas) de luz artificial. Dois ou três animais do mesmo grupo de tratamento foram alojados por gaiola. Os animais tiveram livre acesso à água e comida padrão durante todo o experimento. A ingestão de alimentos não foi medida. O estudo foi conduzido de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e as Diretrizes de Experimentação Animal da Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, São Paulo, SP, Brasil.

Desenho do estudo

Os animais foram submetidos à cirurgia de ligadura do ducto biliar comum (CBDL grupo n=20) como anteriormente descrito^{2,3}. O grupo sham (n=10) foi submetido à laparotomia e mobilização do ducto biliar comum. O grupo controle (n=5), apenas submetidos à análise. Todos os procedimentos se iniciaram com os animais anestesiados com 5% de cloridrato de cetamina 30 mg/kg (Ketalar®, Cristália), e foi administrada dose de manutenção quando necessário. Os animais foram mantidos aquecidos com lâmpadas halógenas 45 W, 127 V. A temperatura corporal foi monitorizada por termômetro digital retal (YSI 4000A termômetro de precisão, EUA) e mantida entre 35°C e 37°C.

Atividade da mieloperoxidase

AMPO foi utilizada como um indicador de neutrófilos no pulmão⁶. As amostras foram homogeneizadas em PBS contendo 0,5% de hexadecil e EDTA 5 mM, pH 6,0, sonicadas e centrifugadas a 3000 xg durante 30 min. O sobrenadante foi medido espectrofotometricamente para a atividade de MPO com base na densidade óptica (460 nm) que muda devido à decomposição de H₂O₂ na presença de o-dianisidina. Os resultados foram expressos como DO a 460 nm.

Método estatístico

A análise estatística foi realizada utilizando

GraphPad Prism Software®. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os dados foram apresentados como média±desvio padrão (DP) para as variáveis contínuas. As comparações entre os grupos foram feitas utilizando uma análise de variância Kruskal-Wallis (não paramétrico ANOVA) e post-hoc teste de Dunn- Bonferroni foi utilizado para realizar comparações múltiplas.

RESULTADOS

Neste estudo, foram utilizados 20 ratos para o modelo experimental de SHP (CBDL). O grupo sham foi composto por 10 animais. O grupo controle foi composto por cinco. Após decorridos os 28 dias do procedimento cirúrgico, os achados macroscópicos no grupo CBDL mostrou evidência de doença hepática em todos os ratos operados. Estatísticos significativamente foram os achados laboratoriais observados no grupo SHP experimental, observando elevação das enzimas hepáticas (AST, ALT), bilirrubinas total e direta e GGT, quando comparados aos grupos controle e sham. A avaliação dos gases no sangue arterial no grupo CBDL apresentaram níveis mais baixos de PO₂ e saturação de O₂.

A avaliação da atividade da MPO (Figura 1) mostrou que os níveis foram significativamente aumentados no grupo CBDL em comparação aos outros grupos. Atividade da MPO foi maior no grupo CBDL que o grupo controle ($p < 0,05$) e o grupo sham ($p < 0,05$).

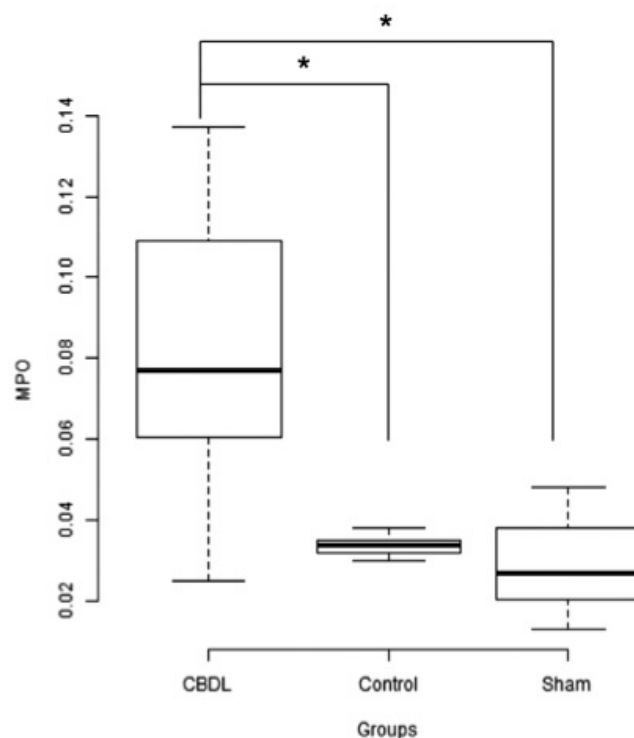


FIGURA 1 - Atividade da mieloperoxidase (MPO) entre os grupos

DISCUSSÃO

Neste estudo, como demonstrado por alguns autores, a indução de cirrose biliar por CBDL em ratos é um modelo experimental estabelecido para o SHP^{2,3}.

Os níveis da atividade de MPO foram significativamente maiores no grupo CBDL em comparação com os outros grupos. A atividade de MPO em modelos de cirrose com SHP foi explorado antes por outros autores que propuseram a MPO estar envolvida na regulação da expressão do iNOS⁶.

Os principais achados da SHP experimental são dilatação da microvasculatura pulmonar e angiogênese que levam à anormal troca gasosa pulmonar⁷. No entanto, o acúmulo de monócitos no intravascular e a angiogênese devem ser um ponto importante neste fisiopatologia⁹.

CONCLUSÃO

A atividade da MPO fica aumentada na SHP experimental em ratos.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Epidemiologia e Estatística do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

REFERÊNCIAS

1. Fallon MB: Mechanisms of pulmonary vascular complications of liver disease: hepatopulmonary syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2005, 39(4 Suppl 2):S138-142.
2. Fallon MB, Abrams GA, McGrath JW, Hou Z, Luo B: Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol* 1997, 272(4 Pt 1):G779-784.
3. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ: Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984, 65(3):305-311.
4. Luo B, Tang L, Wang Z, Zhang J, Ling Y, Feng W, Sun JZ, Stockard CR, Frost AR, Chen YF et al: Cholangiocyte endothelin 1 and transforming growth factor beta1 production in rat experimental hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 2005, 129(2):682-695.
5. Palma DT, Fallon MB: The hepatopulmonary syndrome. *J Hepatol* 2006, 45(4):617-625.
6. Wang Y, Wang W, Zhang Y, Zhao X, Yang D: Clinical significance of a myeloperoxidase gene polymorphism and inducible nitric oxide synthase expression in cirrhotic patients with hepatopulmonary syndrome. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2010, 30(4):437-442.
7. Zhang J, Fallon MB: Hepatopulmonary syndrome: update on pathogenesis and clinical features. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012, 9(9):539-549.
8. Zhang J, Ling Y, Tang L, Luo B, Pollock DM, Fallon MB: Attenuation of experimental hepatopulmonary syndrome in endothelin B receptor-deficient rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009, 296(4):G704-708.
9. Zhang J, Luo B, Tang L, Wang Y, Stockard CR, Kadish I, Van Groen T, Grizzle WE, Ponnazhagan S, Fallon MB: Pulmonary angiogenesis in a rat model of hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 2009, 136(3):1070-1080.