

SIMONE MARQUES BOLONHEIS

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM MÚSCULOS ESQUELÉTICOS DE RATOS
SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: **Farmacologia**

Orientador: **Prof. Dr. Marcelo N. Muscará**

São Paulo
-2009-

RESUMO

Bolonheis SM. Alterações bioquímicas em músculos esqueléticos de ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

A disfunção de músculos esqueléticos é comum durante a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) causada por infecções (sepsis). Está associada ao desenvolvimento de fraqueza muscular prolongada e dificuldade no desmame da ventilação mecânica em pacientes internados em UTI. Esta disfunção está relacionada à produção de citocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) nos músculos esqueléticos. Contudo, não existem dados na literatura documentando a ocorrência de disfunção contrátil durante a SIRS causada por isquemia e reperfusão intestinal. Assim, este trabalho teve como objetivo confirmar o modelo de IRI como causador de SIRS e analisar a presença de algumas citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10), marcadores da produção de ROS e a via L-arginina-NO em músculo respiratório (diafragma) e de membros inferiores (tibial anterior) de ratos submetidos a períodos iniciais de reperfusão (2 e 6 h) após isquemia intestinal. Avaliamos também a função da cadeia transportadora de elétrons e a contratilidade do músculo diafragma em animais submetidos a duas horas de reperfusão. Nossos resultados demonstram que a indução de IRI causa aumento na concentração sérica de citocinas, bem como em parâmetros bioquímicos de lesão renal e hipoperfusão tecidual (lactato). Ainda, a IRI aumenta a expressão de citocinas, promove alterações na via L-arginina-NO e causa danos oxidativos em lipídeos e proteínas em ambos os tipos musculares estudados, porém de forma dependente do tecido e do tempo de reperfusão considerado. Ainda, a atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons (CTE) está aumentada no diafragma após duas horas de reperfusão, o que pode representar uma fonte de produção de anion superóxido em nosso modelo experimental. Estas alterações não afetam a função contrátil do diafragma após duas horas de reperfusão, mas podem ser importantes para o desenvolvimento de disfunção muscular em tempos posteriores de reperfusão.

Palavras-chave: Isquemia e reperfusão intestinal. Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica. Músculo esquelético. Óxido Nítrico. Estresse oxidativo. Citocinas.

ABSTRACT

Bolonheis SM. Biochemical alterations in skeletal muscle from rats submitted to intestinal ischemia and reperfusion [Doctor Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Skeletal muscle dysfunction is a common finding during systemic inflammatory response syndrome (SIRS) caused by infection (sepsis). This dysfunction complicates weaning from mechanical ventilation and causes an intense and prolonged muscle weakness that persists for months after discharge from intensive care units. It is associated with increased production of cytokines, nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) in skeletal muscles. However, there are no available data related to its occurrence in the setting of SIRS caused by intestinal ischemia and reperfusion (IIR). In this way, this project aimed: to confirm SIRS as a consequence of induction of IIR, as well as the involvement of some cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10), markers of ROS production and the L-arginine-NO pathway in a respiratory muscle (diaphragm) and in a hind limb muscle (*tibialis anterior*) from rats submitted to IIR at early-time points (2 and 6 hours of reperfusion). We have also evaluated the function of electron transport chain (ETC) and contractile force of diaphragms after 2 hours of reperfusion. Results show that induction of IIR causes increase in cytokine concentrations in serum as well as in markers of renal injury and tissue hypoperfusion. In addition, in skeletal muscles, it increases the expression of inflammatory cytokines, causes oxidative damages in lipids and proteins, as well as alterations on L-arginine-NO pathway. Both types of skeletal muscles are affected but in different patterns and depending on reperfusion period. Moreover, the activity of complex I of mitochondrial ETC was increased in diaphragm muscle which may represent a superoxide anion source in our experimental model. These alterations did not affect contractile function of diaphragm muscle after two hours of reperfusion, but must be important to the development of muscular dysfunction at later reperfusion periods.

Keywords: Intestinal ischemia and reperfusion. Systemic inflammatory response syndrome. Skeletal muscle. Nitric oxide. Oxidative stress. Cytokines.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ISQUEMIA E REPERFUSÃO

Isquemia é a redução do suprimento sanguíneo que ocorre quando o fluxo arterial está diminuído ou ausente, proporcionando hipóxia celular. Dependendo da gravidade do estado de hipoperfusão tecidual, as células podem se adaptar a baixa oferta de oxigênio, sofrer lesão de leve à moderada ou morrer (Cotran et al.,1996).

A falta de oxigênio afeta primeiramente as mitocôndrias, reduzindo a fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, a formação de ATP. Ocorre aumento da glicólise anaeróbica, a qual apresenta menor rendimento na geração de ATP, aumento de ácido láctico e redução de pH intracelular, bem como redução dos estoques de glicogênio. A depleção de ATP causa diminuição dos processos dependentes de energia, entre os quais a atividade da Na^+/K^+ -ATPase, com conseqüentes modificações nas concentrações intracelulares de sódio e cálcio (aumento) e potássio (redução). O aumento intracelular de Na^+ e água, bem como o acúmulo de catabólitos, como fosfatos, lactato e nucleosídeos promovem a formação de edema celular. Outras conseqüências da privação de oxigênio incluem o descolamento de ribossomos do retículo endoplasmático rugoso, formação de vesículas e dissociação de lipoproteínas de membrana. Tais alterações são reversíveis se a oxigenação for restaurada em tempo hábil (Collard e Gelman, 2001; Carden e Granger, 2000).

Contudo, com o aumento do tempo de isquemia, outras alterações podem ocorrer de forma irreversível e incluem o aumento ainda mais intenso do influxo de cálcio e liberação de seus estoques intracelulares (mitocôndria e retículo endoplasmático) principalmente após a restauração da oxigenação. Desta forma, ocorre ativação de enzimas dependentes de Ca^{2+} , tais como fosfolipases ocasionando danos a membranas, proteases, ATPases, as quais causam depleção ainda maior de ATP e endonucleases. Tais modificações estão associadas morfológicamente à intensa vacuolização das mitocôndrias, extenso dano às membranas e tumefação e rompimento de lisossomos. A lesão das membranas lisossomais gera vazamento e ativação de enzimas, com digestão enzimática de componentes celulares. Ocorre, ainda, vazamento de componentes intracelulares para o líquido extracelular, tais como a lactato desidrogenase, a qual é um marcador de lesão tecidual (Collard e Gelman, 2001; Carden e Granger, 2000).

A duração da hipóxia para que ocorra dano irreversível varia de acordo com o tecido. O cérebro precisa de três a cinco minutos de interrupção do fluxo arterial, o fígado necessita de uma a duas horas, enquanto o rim somente sofre lesões irreversíveis com tempos de isquemia superiores a seis horas. Ainda, períodos de isquemia maiores que 30 minutos são suficientes para causar lesões irreversíveis no intestino delgado (Schoenberg e Beger, 1993).

Por sua vez, a reperfusão (restauração do fluxo sanguíneo) é necessária a fim de prevenir lesões celulares irreversíveis. Contudo, a reperfusão pode aumentar ainda mais a lesão tecidual inicial, como demonstrado por Parks e Granger em 1986. Estes autores demonstraram que as lesões na mucosa produzidas por três horas de isquemia intestinal, seguida de uma hora de reperfusão são mais graves que as alterações observadas após quatro horas de isquemia somente.

Durante a isquemia, a quebra do ATP é acompanhada de acúmulo de hipoxantina e conversão da enzima xantina-desidrogenase, a qual utiliza NAD^+ comoceptor final de elétrons, à xantina oxidase (XO), que por sua vez, tem O_2 comoceptor de elétrons. Assim, quando o oxigênio é reintroduzido nas células, a XO degrada hipoxantina e reduz O_2 molecular, gerando grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS), entre as quais, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (McCord e Roy, 1982; Granger, 1988). A fase de reperfusão dos tecidos isquêmicos é também associada com ativação e migração de leucócitos, sendo que tais fenômenos são essenciais para o desenvolvimento das lesões locais (Romson et al., 1983; Grisham et al., 1986). Os polimorfonucleares neutrófilos (PMN) ativados contribuem para a formação de lesões por meio de vários mecanismos, os quais incluem liberação de ROS como resultado do *burst* oxidativo mediado pelo sistema NADPH oxidase, liberação de enzimas proteolíticas e estimulação da liberação de citocinas pelas células locais, o que aumenta ainda mais o recrutamento de células. (Carden e Granger, 2000).

1.2 ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL (IRI)

A isquemia e reperfusão intestinal (IRI) ocorre quando há ausência ou redução do fluxo sanguíneo para os intestinos, por obstrução ou vasoconstrição de artérias e veias viscerais. Dentre os principais vasos sanguíneos afetados destacam-se a artéria celíaca, a artéria mesentérica superior (AMS) e a artéria mesentérica inferior e/ou veias correspondentes (Kolkman e Geelkerken, 2005).

A etiologia da IRI pode ser classificada em: *a)* Oclusiva: causada pela obstrução mecânica por trombos ou êmbolos, e *b)* Não-oclusiva: originada por vasoconstrição esplâncnica em resposta a hipovolemia, hipotensão ou redução de débito cardíaco (Oldenburg et al., 2004). Nestes casos, a vasoconstrição ocorre para aumentar o fluxo sanguíneo para órgãos vitais para a sobrevivência do organismo, tais como, cérebro, coração, pulmões e rins (Ceppa et al., 2003). Entre os mediadores envolvidos na vasoconstrição incluem-se a adrenalina, sistema renina-angiotensina e endotelina-1 (Yasuhara, 2005; Kolkman e Geelkerken, 2005).

A IRI não oclusiva ocorre precocemente em condições de estresse circulatório. Assim, tem papel importante na fisiopatologia do choque hipovolêmico, presente em traumas, hemorragias, grandes queimados, pancreatite, grandes cirurgias abdominais (transplantes, ressecção de aneurisma de aorta). Pode estar presente também no choque cardiogênico, originado por infarto agudo do miocárdio e no choque séptico (Dias et al., 2008; Guyton e Hall, 2005). Além disso, a vasoconstrição mesentérica pode ser conseqüência da utilização de agentes vasoconstritores como a noradrenalina em doses elevadas. Outras condições associadas à IRI não-oclusiva são estrangulação de hérnias, hérnia brida, aderência intestinal e enterocolite necrotizante (Mallick et al., 2004).

Embora não seja uma condição muito freqüente, a IRI é associada a altas taxas de mortalidade, que podem variar de 60 a 93% dos casos (Valera 2006). A morbidade associada também é importante, uma vez que o paciente pode apresentar sinais da síndrome do intestino curto, caracterizada por diarreia, má absorção de água, eletrólitos e conseqüente perda de peso (Schoenberg e Begeer, 1993).

Os danos decorrentes da IRI são mediados pela formação de ROS, liberação dos estoques locais de ferro, lesões de microvasculatura, liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios, infiltração e ativação de neutrófilos, agregação plaquetária e ativação do sistema complemento (Carden e Granger, 2000).

1.2.1 Mediadores formados durante a IRI

1.2.1.1 Espécies reativas derivadas do oxigênio (ROS)

As ROS ocorrem naturalmente no organismo, como subproduto do metabolismo. Desempenham vários papéis, participando de processos de sinalização e destruindo

patógenos, porém quando produzidas em excesso, podem causar lesão e morte celular (Augusto, 2006). As principais ROS são o ânion superóxido, seu produto de redução, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH\cdot$), o qual pode ser formado a partir do H_2O_2 tanto espontaneamente (reação de Haber-Weiss) como por catálise por metais de transição (Halliwell e Gutteridge, 2007). Estas espécies podem oxidar proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, danificando membranas e alterando funções celulares (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Dentre as alterações celulares induzidas pelas ROS destaca-se aqui a peroxidação lipídica (PL), a qual é a deterioração oxidativa de lipídeos poliinsaturados. Entre os lipídeos que são alvos para esta modificação incluem-se as lipoproteínas constituintes de membranas celulares. A PL reduz a fluidez das membranas, aumenta sua permeabilidade e danifica proteínas, levando a inativação de enzimas e canais iônicos. Estes últimos efeitos podem ser mediados pelos produtos gerados pela fragmentação dos peróxidos de lipídeos, entre os quais se destacam o malondialdeído (MDA) e 4-hidroxi-2-trans-nonenal (HNE). A principal ROS envolvida no processo de iniciação da PL é o radical $OH\cdot$, o qual pode ser formado a partir da decomposição de H_2O_2 , na presença de ferro (Fe^{2+}) em processo conhecido como reação de Fenton (Augusto, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007). As etapas envolvidas na PL estão ilustradas na Figura 1.

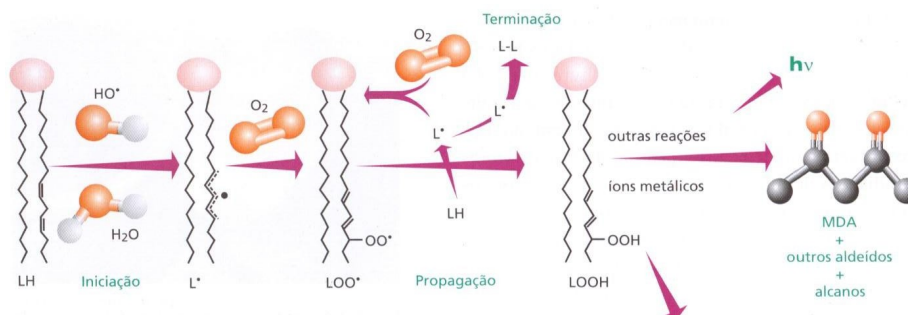


Figura 1- O processo de peroxidação lipídica. Na fase de iniciação, um radical reativo como o radical $OH\cdot$ remove hidrogênio do ácido graxo insaturado do lipídio (LH) produzindo um radical de lipídio ($L\cdot$). Este reage com O_2 , formando o radical peroxila ($LOO\cdot$), o qual atrai hidrogênio de outro lipídio. Na fase de propagação, forma-se o hidroperóxido de lipídio (LOOH) e outro $L\cdot$ que reage com o O_2 , e assim por diante. Depois, na terminação, os dois radicais se combinam e formam um não radical. O LOOH pode sofrer outras reações, a maioria degradativa, que produzem aldeídos e alcanos de diferentes pesos moleculares. Esses produtos são utilizados para monitorar os processos de peroxidação lipídica em condições fisiológicas e patológicas.

FONTE: Augusto, 2006.

A produção de ROS é contrabalançada pelos sistemas antioxidantes celulares, os quais incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase, α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C), glutathiona reduzida, ubiquinona, ácido úrico, entre outros.

A SOD é uma enzima amplamente distribuída em organismos aeróbios e tem como função catalisar a dismutação do ânion superóxido em H_2O_2 e O_2 . Até o momento, foram caracterizadas três isoformas da enzima. A isoforma contendo zinco e cobre (SOD-1 ou Cu,Zn-SOD) possui 16 kDa e está localizada no citossol das células, onde sua concentração é estimada ser da ordem de 10 μ M. Por outro lado, a SOD contendo manganês (Mn-SOD ou SOD-2) é uma proteína de 24 kDa localizada na mitocôndria, enquanto que a SOD extracelular contendo zinco e cobre no grupo prostético (EC-SOD ou SOD-3), localiza-se no espaço extracelular (McCord e Edeas, 2005).

Em relação à participação de ROS nas lesões IRI, esta foi confirmada pela observação de que a administração de SOD protege a mucosa intestinal durante IRI (Granger et al., 1981; Zimmerman et al., 1988). Tal efeito também foi relatado com a utilização de um mimético estável da SOD (Cuzzocrea et al., 2001). As alterações celulares presentes durante a IRI estão associadas à redução da atividade da SOD e dos estoques celulares de glutathiona reduzida (GSH) e ocorrem principalmente durante a reperfusão (Grisham et al., 1986).

1.2.1.2 Citocinas

Citocinas pró- e anti-inflamatórias são produzidas principalmente durante a fase de reperfusão, destacando-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α ; Caty et al., 1990), interleucina (IL)-1 β , IL-6 (Sun et al., 1999), IL-8 (Tsuruma et al., 1996) e IL-10 (Souza et al., 2001). Durante a IRI, o estímulo para a ativação da produção de citocinas são as ROS (Granger et al., 1981; Zimmerman et al., 1988) e o próprio estado de hipóxia celular (Shenkar et al., 1993; Karakurum et al., 1994; Koga et al., 1992; Shreeniwas et al., 1992; Yan et al., 1995). Estas citocinas, formadas durante a IRI em grandes quantidades, são liberadas diretamente no sangue (Caty et al., 1990) e linfa (Cavriani et al., 2005, 2007) ou podem ser absorvidas após liberação no peritônio (Narita et al., 2004). Todas estas citocinas podem atuar de forma endócrina, isto é, em locais distantes do sítio de produção inicial causando lesões em órgãos distantes (Dinarello e Moldawer, 2000) e sua produção está correlacionada com o grau de lesão das células intestinais (Grotz et al., 1999).

A ativação dos fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B), faz com que estes se liguem a seqüências promotoras no DNA e aumentem a transcrição de genes de citocinas. O fator de transcrição NF- κ B é um elemento fundamental na regulação de genes envolvidos na síntese de citocinas e moléculas de adesão. A ativação do NF- κ B ocorre quando a proteína inibitória I- κ B se dissocia do complexo formado pelos dois elementos anteriores. Esta dissociação pode ser causada pela fosforilação do I- κ B em resíduos de serina por kinases do complexo IKK, as quais por sua vez, são também reguladas por fosforilação. As ROS, especialmente o H₂O₂, alterariam esta cascata de fosforilação por modificação oxidativa de grupos tiol de enzimas envolvidas nestas vias (Flohe et al., 1997; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Dentre as citocinas produzidas durante a IRI, o TNF- α possui papel central no desenvolvimento das lesões intestinais, da inflamação sistêmica e na letalidade após a IRI. Provavelmente, a produção inicial de TNF- α por células residentes intestinais (mastócitos) ou a liberação de estoques pré-formados em mastócitos, células de Paneth e células endócrinas das criptas intestinais (Schmauder-Chock et al., 1994) seja suficiente para induzir moléculas de adesão (selectinas e ICAM-1) e a migração de neutrófilos, os quais aumentam ainda mais a liberação de TNF- α e outras citocinas (Souza et al., 2001). Após sua liberação, o TNF- α é capaz de aumentar a síntese de óxido nítrico, assim como o metabolismo do ácido araquidônico, por ativação das enzimas cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX), aumentando a produção de tromboxano e prostaglandinas (PG), em especial a PGE₂. Apesar de possuir meia vida curta, o TNF- α é capaz de induzir a síntese de outras citocinas, com destaque para IL-6, IL-8, interferon (IFN- γ) e IL-10, além de alterar a produção de corticosteróides endógenos (Dinarello e Moldawer, 2000).

A secreção de IL-1 β é estimulada pelo TNF- α , por componentes do sistema complemento (C5a) e pela própria isquemia (Koga et al., 1992), sendo que as principais células produtoras de IL-1 β são monócitos e macrófagos. A IL-1 estimula a medula óssea, aumentando a produção e liberação de neutrófilos. Além disso, aumenta a síntese de outras citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , e a expressão de quimiocinas e moléculas de adesão após IRI (Wyble et al., 1996; Dinarello, 2005). Ainda, ativa a transcrição de várias proteínas inflamatórias via ativação de NF- κ B, incluindo isoforma tipo-2 da COX (COX-2) e a isoforma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS; Dinarello e Moldawer, 2000). A IL-1 β , juntamente com o NO, estão relacionados à hiporreatividade de vias aéreas após a IRI (Coelho et al., 2007).

Apesar da IL-6 surgir tardiamente em relação às outras citocinas (TNF- α e IL-1 β), o seu tempo de meia vida é maior, permanecendo na circulação e tecidos durante tempos mais prolongados (Shalaby et al., 1989). A IL-6 inibe a apoptose de neutrófilos, aumentando seu número e promove a resposta de fase aguda hepática, induzindo a formação das proteínas de fase aguda da inflamação (Dinarello e Moldawer, 2000). Possui papel regulatório da resposta inflamatória, atuando como mediador pró- e anti-inflamatório (Xing et al., 1998). Assim, induz a liberação do receptor solúvel de TNF- α e do antagonista de receptor de IL-1 β , reduzindo a ação de tais citocinas (Tilg et al., 1994). É bem documentado que a IL-6 medeia resposta aguda durante hemorragia, trauma, sepse e que altas concentrações de IL-6 circulante correlacionam-se positivamente com a taxa de mortalidade (Roumen et al., 1993; Schluter et al., 1991). Além disso, após a oclusão de AMS em animais com deficiência de IL-6 (IL-6 *knock-out*), houve atenuação da expressão de moléculas de adesão e redução da lesão celular mediada por neutrófilos, reduzindo a taxa de mortalidade (Cuzzocrea et al., 1999). Estes fatos indicam a importância da IL-6 no desenvolvimento da MODS que acompanha a IRI. A liberação de IL-6 em modelo de IRI é modulada por TNF- α e IL-1 β (Yao et al., 1997).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, que inibe a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e células T *helper* (Fiorentino et al., 1991a,b) e aumenta os níveis do antagonista de receptor de IL-1 β , reduzindo, desta forma, as ações desta citocina (Cassatella et al., 1994; Mosser e Zhang, 2008). Durante a IRI, a síntese de IL-10 pode ser ativada pela IL-1 e, em menor grau, pelo TNF- α (Souza et al., 2003). Os efeitos da IL-10 na IRI são caracterizados pela redução da produção e liberação de TNF- α , na tentativa de reduzir as ações deletérias de tal citocina. Além disso, as lesões decorrentes da IRI no intestino e a infiltração de neutrófilos no pulmão são diminuídas (Lane et al., 1997; Souza et al., 2003). Contudo, apesar de reduzir a agressão da lesão local, em órgãos à distância e, de maneira geral, diminuir a disfunção orgânica frente a situações de estresse como traumas e queimaduras, a IL-10 é capaz de causar intensa imunossupressão. Desta forma, níveis aumentados de IL-10 são correlacionados com maior mortalidade devido a infecções secundárias e sepse (Sherry et al., 1996; Lyons et al., 1997).

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

