

**ÁREA TEMÁTICA:**

- COMUNICAÇÃO
- CULTURA
- DIREITOS HUMANOS E JUSTIÇA
- EDUCAÇÃO
- MEIO AMBIENTE
- SAÚDE
- TRABALHO
- TECNOLOGIA

**ALOPURINOL COMO FATOR PROTETOR NA INFLAMAÇÃO PÓS ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM RATOS WISTAR**

**Gabriela Moreira Mahle (gabrielammahle@gmail.com)**

**Ricardo Zanetti Gomes (zanetticons@uol.com.br)**

**RESUMO** – A isquemia trás inúmeros malefícios aos tecidos acometidos podendo levar a morte celular. Sendo assim é imprescindível que o fluxo sanguíneo seja restaurado. Infelizmente, a reperfusão, apesar de necessária, pode causar danos ainda maiores, tanto local quanto sistemicamente. O mecanismo desses danos se dá em grande parte pela inflamação – induzida principalmente pela citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) – a qual têm na sua gênese as espécies reativas de oxigênio (ERO). Essas ERO são geradas durante a reperfusão através da enzima xantina oxidase, acumulada nos tecidos durante a isquemia. Sendo o alopurinol um inibidor dessa enzima, representa uma possibilidade terapêutica para a redução do traumatismo por reperfusão, através da diminuição das ERO. Para testar essa possibilidade, foram utilizados 60 ratos Wistar (30 tratados com solução fisiológica, e 30 tratados com alopurinol), os quais foram submetidos a diferentes tempos de isquemia e posterior reperfusão por 72 horas. Então, tiveram seus TNF-alfa séricos mensurados e comparados. Sendo considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ . Houve diferença significativa entre os níveis de TNF-alfa sérico dos ratos tratados com alopurinol e dos ratos tratados solução fisiológica ( $p < 0,001$ ). Nesse modelo experimental o alopurinol se mostrou como um fator protetor na inflamação pós isquemia e reperfusão.

**PALAVRAS-CHAVE** – Traumatismo por Reperfusão. Espécies de Oxigênio Reativas. Fator de Necrose Tumoral alfa. Alopurinol.

**Introdução**

A isquemia é definida como a redução do fluxo sanguíneo, e, apesar de ter papel fundamental em muitas situações clínicas perioperatórias, trás diversos malefícios para os tecidos acometidos. As células precisam sintetizar continuamente adenosina trifosfato (ATP) para manter a sua integridade e função. Essa síntese depende de reações de oxirredução que acontecem em nível mitocondrial. Na falta do aporte de oxigênio, a síntese do ATP celular fica diminuída e a energia disponível não é mais capaz de manter o correto funcionamento das bombas da membrana celular. Na falha dessas bombas é perdido o gradiente normal de íons intra e extracelulares, o qual é essencial para a sobrevivência celular.

Sendo assim, é imprescindível que o suprimento sanguíneo seja reestabelecido, afim de evitar dano celular irreversível. Ironicamente, a reperfusão *per se* é capaz de agravar o

dano celular isquêmico, pois a chegada do oxigênio, com consequente produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) associada à intensa participação de neutrófilos amplia a reação inflamatória, levando a edema celular e intersticial, infiltrado leucocitário, trombose da microcirculação e necrose tecidual. Ainda mais importante, a lesão de isquemia e reperfusão (I/R) pode levar a complicações sistêmicas, como a síndrome da angústia respiratória do adulto, disfunções renais e hepáticas, e até à temida síndrome de disfunção sistêmica de múltiplos órgãos.

À esse agravamento das lesões teciduais foi dado o nome de “paradoxo do oxigênio”, descrito em 1973. Hoje, sabe-se que a I/R gera radicais livres que atuam sobre lipídeos, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, um fenômeno chamado “estresse oxidativo”, e levam a modificações da função e da estrutura celular podendo leva-la à morte.

Outro agente importante envolvido nessas agressões tanto locais, quanto sistêmicas é a inflamação desencadeada pela I/R. O fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), também conhecido como caquetina, é uma forte citocina pró-inflamatória, que atua de maneira importante no sistema imunológico durante a inflamação, a proliferação e a diferenciação celular, e a apoptose. O objetivo da inflamação é erradicar o agente agressor e acelerar a regeneração tissular. Entretanto, uma reação inflamatória inadequada pode resultar em lesão tecidual, e em casos mais severos evoluir para falência de órgãos e morte.

Levando em consideração que as ERO fazem parte do mecanismo de indução da inflamação, postula-se que diminuindo sua produção também diminuiremos a inflamação, minimizando assim o traumatismo por reperfusão. A produção das ERO acontece, principalmente, nas células hipóxicas, onde o ATP é metabolizado em ADP, AMP, adenosina, inosina e finalmente nos substratos da xantina oxidase, a hipoxantina e a xantina. Então, as últimas reagem com a xantina oxidase durante a reperfusão, quando o oxigênio molecular é reintroduzido no tecido, para produzir ânion superóxido e peróxido de hidrogênio.

Sendo o alopurinol e seu metabólito principal, a aloxantina, inibidores competitivo e não competitivo, respectivamente, da enzima xantina-oxidase, ele representa uma possibilidade terapêutica para a redução dos danos secundários à I/R, através da diminuição da produção de ERO.

O objetivo do presente estudo foi investigar o potencial efeito protetor do alopurinol no traumatismo por reperfusão pela determinação da resposta inflamatória através da medida do TNF-alfa sérico em ratos Wistar submetidos a isquemia e reperfusão.

## **Objetivos**

O objetivo do presente estudo foi investigar o potencial efeito protetor do alopurinol no traumatismo por reperfusão pela determinação da resposta inflamatória através da medida do TNF-alfa sérico em ratos Wistar submetidos a isquemia e reperfusão.

### Referencial teórico-metodológico

Após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), processo CEUA 019/2013, foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, com idades entre 123 e 138 dias e pesos de  $256,3 \pm 8,48$  gramas, provenientes do biotério da UEPG. Os animais foram mantidos durante o experimento no próprio biotério, sendo levados para o Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental apenas para realização do procedimento. Os ratos foram aleatoriamente separados em grupos conforme descrito no Quadro 1:

**QUADRO 1 – DEMONSTRATIVO DA ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DO ESTUDO**

Grupos	Subgrupos		N
Controle (C)	C-2h	Tratamento com solução fisiológica, isquemia 2 horas e reperfusão por 72 horas	10
	C-3h	Tratamento com solução fisiológica, isquemia 3 horas e reperfusão por 72 horas	10
	C-S	Tratamento com solução fisiológica, simulação da isquemia	10
Alopurinol (A)	A-2h	Tratamento com alopurinol, isquemia 2 horas e reperfusão por 72 horas	10
	A-3h	Tratamento com alopurinol, isquemia 3 horas e reperfusão por 72 horas	10
	A-S	Tratamento com alopurinol, simulação da isquemia	10

O ratos do grupo alopurinol receberam por gavagem com sonda rígida, dose de 100mg/kg de alopurinol uma hora antes do procedimento cirúrgico. Enquanto os ratos do grupo controle receberam por gavagem com sonda rígida, dose equivalente ao peso de solução fisiológica, também uma hora antes do procedimento cirúrgico.

Todos os ratos foram anestesiados com 50mg/kg de Cetamina (Ketamin<sup>®</sup>) associada a 10mg/kg de Xilazina (Calmiun<sup>®</sup>) que foram administradas por via intramuscular na musculatura da panturrilha. Após a indução anestésica foram submetidos à tricotomia ampla do abdômen, fixados em decúbito dorsal e submetidos à antisepsia com álcool iodado. Então foram dispostos campos cirúrgicos esterilizados sobre os animais.

Foi então procedida em cada rato uma laparotomia por incisão mediana xifopúbica com abertura de todos os planos da parede abdominal e exposição da cavidade abdominal.

Com o auxílio de pinça curva dissecou-se o peritônio parietal posterior e separou-se a veia cava da aorta infra-renal.

Conforme os subgrupos planejados (Quadro 1), foram procedidos o clampeamentos aórticos por duas horas (subgrupos C-2h e A-2h) e três horas (subgrupos C-3h e A-3h) respectivamente. Durante estes períodos de isquemia foram colocadas gazes umedecidas em solução salina isotônica sobre a ferida operatória para evitar perda de líquido por evaporação. Após os períodos de isquemia eram retirados os clampes e era procedido o fechamento da ferida cirúrgica por sutura contínua em dois planos com Vicryl® 000 (Johnson & Johnson).

Nos subgrupos C-S e A-S não foi procedida a isquemia, sendo somente feita a dissecação da veia cava da aorta infra-renal, manutenção por três horas e fechamento da ferida cirúrgica como anteriormente descrito.

Todos os ratos eram remetidos ao biotério e mantidos por 72 horas recebendo ração específica para a espécie (Nuvilab - Nuvital®) e água *ad libitum*.

Após as 72 horas dos procedimentos cirúrgicos, todos os ratos foram anestesiados conforme descrito anteriormente. Foi realizada antissepsia da pele da região torácica com álcool iodado e punção cardíaca para coleta de sangue. Consequentemente, a exsanguinação induzia parada cardiorrespiratória nos ratos. O sangue era então centrifugado e o plasma de cada rato era transferido para três frascos de vidro (1 ml em cada) para mensuração da quantidade de TNF-alfa em cada uma das amostras, por método ELISA.

Os resultados dos grupos foram expressados sob a forma de média e desvio-padrão, obtidos entre as triplicatas nas dosagens de TNF-alfa. Aplicou-se a análise de variância ANOVA e para comparações pareadas entre grupos o teste de Tukey a fim de verificar quais grupos diferiam entre si. Foi considerado como significativo o valor de  $p < 0,05$ .

## Resultados

Os resultados das dosagens de TNF-alfa foram obtidos em triplicata para que estes dados fossem validados. Na avaliação estatística destes achados não houve diferenças significantes entre as médias das amostras dentro dos subgrupos ( $p > 0,05$ ).

As médias dos resultados obtidos no grupo Controle foram, no subgrupo C-S de  $37,0 \pm 5,8$ , no subgrupo C-2h de  $347,1 \pm 101,9$  e no subgrupo C-3h de  $749,6 \pm 99,6$ . No grupo Alopurinol as médias dos subgrupos A-S, A-2h e A-3h foram respectivamente  $33,6 \pm 6,7$ ,  $34,1 \pm 9,3$  e  $280,7 \pm 93,6$ , conforme descritos na tabela 1.

**TABELA 1 – DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE TNF-ALFA NOS SUBGRUPOS**

Grupos e Subgrupos	Controle			Alopurinol		
	C-2h	C-3h	C-S	A-2h	A-3h	A-S
Média	347,1	749,6	37,0	34,1	280,7	33,6
Desvio-padrão	101,9	99,6	5,8	9,3	93,6	6,7

Nas comparações entre as médias e desvios-padrão das dosagens de TNF-alfa foram observadas diferenças estatísticas ( $p < 0,001$ ) entre C-S x C-2h, entre C-S x C-3h, entre A-S x A-3h, entre C-2h x C-3h, entre A-2h x A-3h, entre C-2h x A-2h e entre C-3h x A-3h. Não foram encontradas diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) entre C-S x A-S, e entre A-S x A-2h, conforme demonstrado na tabela 2.

**TABELA 2 – DEMONSTRATIVO DAS COMPARAÇÕES ENTRE AS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE TNF-ALFA NOS SUBGRUPOS**

Comparações	Grupo		Grupo	p	Conclusão
Entre os simulação de cada grupo	C-S	X	A-S	$>0,05$	NS
Entre cada simulação de cada grupo e os subgrupos isquemia	C-S	X	C-2h	$<0,001$	S
		X	C-3h	$<0,001$	S
	A-S	X	A-2h	$>0,05$	NS
		X	A-3h	$<0,001$	S
Entre os subgrupo isquemia	C-2h	X	C-3h	$<0,001$	S
	A-2h	X	A-3h	$<0,001$	S
	C-2h	X	A-2h	$<0,001$	S
	C-3h	X	A-3h	$<0,001$	S

### Considerações Finais

A I/R, e o conseqüente estresse oxidativo, está associada a inúmeras condições clínicas e cirúrgicas, tais como: sepse, trauma oclusivo arterial, parada cardíaca, trombose, embolia, vasoespasmos, tumores, transplantes e ressecções de órgãos, acidentes vasculares encefálicos, e infarto do miocárdio. Sendo assim, muitas têm sido as pesquisas para diminuir a inflamação que segue a I/R, e assim diminuir os danos que atingem diversos órgãos vitais.

Em nosso modelo experimental, o alopurinol foi capaz de diminuir o TNF-alfa significativamente, quando comparado com o subgrupo controle equivalente (C-2h X A-2h e C-3h X A-3h). Também demonstramos que a indução dessa citocina pró-inflamatória aumenta conforme o tempo de isquemia (C-2h X C-3h e A-2h X A-3h). O fato da comparação C-S X A-S não ser estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) apenas demonstra que a utilização do alopurinol na ausência de isquemia não altera o TNF-alfa. Ainda mais, o fato da comparação A-S X A-2h ter  $p > 0,05$  nos diz que o alopurinol retém a inflamação praticamente na sua totalidade, quando de uma isquemia de até 2 horas, e parcialmente quando essa isquemia é de 3 horas (A-S X A-3h:  $p < 0,05$ ).

Diante de tais resultados, provamos o efeito protetor do alopurinol no traumatismo por reperfusão em ratos. Sugerimos agora que os próximos estudos procurem reproduzir esses achados em humanos cujas condições clínicas sejam de I/R.

## Referências

- Brasileiro, J.L.; et al. **Isquemia e reperfusão de músculo sóleo de ratos sob ação da pentoxifilina**. J. vasc. bras., Porto Alegre, v.6, n. 1, 2007.
- Castro e Silva Jr, Orlando de; et al. **Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico**. Acta Cir. Bras., São Paulo, 2002.
- Chen, S.; et al. **Asiaticoside attenuates memory impairment induced by transient cerebral ischemia-reperfusion in mice through anti-inflammatory mechanism**. Pharmacol Biochem Behav, v. 122C, 2014.
- Francisco Neto, A.; et al. **Estudo das alterações oxidativas, da capacidade antioxidante total e do óxido nítrico, em ratos submetidos à isquemia e reperfusão de membros posteriores**. Acta Cir Bras [serial online], v.20, n.2, 2005.
- Gomes, R.Z. **Efeito do alopurinol sobre as repercussões da isquemia e reperfusão de membros caudais de ratos Wistar**. (Tese de doutorado) Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2007.
- Hongxin, Wang; et al. **Anti-inflammatory effects of vinpocetine on the functional expression of nuclear factor-kappa B and tumor necrosis factor-alpha in a rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury**. Neurosci Lett, v. 566, n. 30, 2014.
- Kumar, V.; Abbas, A.K.; Fausto, N.; Aster, J.C. **Robbins e Cotran Patologia: Bases patológicas das doenças**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
- Procianoy, R.S.; Silveira, R.C. **Síndrome hipóxico-isquêmica**. Jornal de Pediatria, Rio de Janeiro, v. 77, supl.1, 2001.
- Rachmat, F.D.; et al. **Effect of allopurinol on oxidative stress and hypoxic adaptation response during surgical correction of tetralogy of fallot**. Acta Med Indones, v. 45, n. 2, 2013.
- Rocha, B.C.; et al. **Modelo experimental de isquemia: reperfusão intestinal por clampeamento de aorta abdominal em ratos Wistar**. Rev Col Bras Cir, Rio de Janeiro, v. 39, n. 3, 2012.
- Somaio Neto, Frederico; et al. **Expressão genica associada ao estresse oxidativo no coração de camundongo após isquemia intestinal**. Arq. Bras. Cardiol., São Paulo, v. 102, n. 2, 2014.
- Zelová, H.; Hošek, J. **TNF- $\alpha$  signalling and inflammation: interactions between old acquaintances**. Inflamm Res, v. 62, n. 7, 2013.
- Zweier, J.L.; Talukder, M.A. **The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury**. Cardiovasc Res, v. 70, n. 2, 2006.