

TESTE ALTERNATIVO PARA INDUÇÃO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR COM MONOCROTALINA EM CAMUNDONGOS

KAREN MARTIRENA MONKS DA SILVA¹; PAOLA QUEVEDO DA COSTA²; TAÍS SILVEIRA KÖPP²; FERNANDO DIÓGENES TEIXEIRA MEYER²; PAULO CAVALHEIRO SCHENKEL³

¹ Universidade Federal de Pelotas – martirenakaren@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – quevedopaola97@gmail.com; taiskopp@hotmail.com; fdtmeyer@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – schenkel.paulo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença de diagnóstico tardio e sem cura, relacionada com o aumento progressivo e irreversível da resistência vascular pulmonar, que resulta no aumento da pós carga do ventrículo direito, remodelamento cardiovascular, *cor pulmonale* e óbito (MONTANI et al., 2013; LAU et al., 2017; LAN et al., 2018).

O uso da monocrotalina (MCT), principal alcalóide pirrolizidínico encontrado nas plantas do gênero *Crotalaria*, como modelo experimental para indução de HAP tem sido utilizado há muitos anos por nosso grupo de pesquisa em ratos Wistar. O mecanismo envolvido é relacionado a sua ativação no fígado pela citocromo P450, gerando inúmeros metabólitos, sendo o principal chamado dehidromonocrotalina (WILSON et al. 1992). Este é capaz de atingir órgãos extra-hepáticos como, por exemplo, os pulmões onde induz um remodelamento que evolui para *cor pulmonale* (insuficiência do ventrículo direito), mimetizando sinais da HAP (YAN; HUXTABLE, 1995).

Os procedimentos e modelos experimentais são necessários para que se tenha uma avaliação pré-clínica controlada e de qualidade. Em ratos Wistar as alterações fisiopatológicas decorrentes da indução da HAP são melhores observadas com a administração de dose única (60 mg/kg) de monocrotalina e se tornam críticas após 4 semanas, com alto índice de mortalidade após esse período (ZIMMER et al., 2021; LUDKE et al., 2010). Em camundongos, a monocrotalina tem sido administrada em doses 10 vezes maiores (600 mg/Kg) devido ao metabolismo mais acelerado e à menor sensibilidade destes animais a este alcaloide em relação aos ratos Wistar. Na maioria dos trabalhos essa foi administrada por via subcutânea, 1 vez por semana, durante 8 semanas consecutivas em camundongos C57BL6 (VINKE et al., 2019; AHN et al., 2013; NISHII, Y. et al., 2006).

Ainda sim, existem divergências na literatura quanto ao período de indução e vias de administração da monocrotalina em camundongos. Há trabalhos que utilizaram a monocrotalina por via intraperitoneal (i.p.) em um período que variou de 4 a 10 semanas consecutivas (RIBEIRO et al., 2017; SETA et al., 2011), apresentando características de indução a HAP. Os dados citados foram utilizados para subsidiar a nossa pesquisa e nos gerar indagações sobre novos meios de indução através da utilização de camundongos da mesma espécie, testando assim outra via e tempos de indução.

Na presente pesquisa estamos testando uma via de absorção mais rápida, porém com a mesma dose encontrada na maioria dos trabalhos de indução à HAP em camundongos, diante disso seguiremos com análises adicionais para

compreendermos a eficácia deste modelo de indução e então darmos seguimento nos experimentos que complementarão o trabalho.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados 27 camundongos (14 machos e 13 fêmeas) C57Bl/6. Estes animais foram divididos em 4 grupos experimentais.

- 1) Grupo controle fêmeas (n=5) – animais tratados com solução salina por via intraperitoneal
- 2) Grupo controle machos (n=6) – animais tratados com solução salina por via intraperitoneal
- 3) Grupo MCT fêmeas (n=8) – animais tratados com monocrotalina, por via intraperitoneal (600 mg/Kg)
- 4) Grupo MCT machos (n=8) – animais tratados com monocrotalina, por via intraperitoneal (600 mg/Kg)

Os animais foram tratados uma vez por semana durante duas semanas consecutivas. O peso corporal dos animais e a quantidade de ração consumida foram aferidas semanalmente. Na terceira semana experimental, os animais foram pesados novamente e as fêmeas tiveram o seu ciclo estral analisado, através de esfregaço vaginal. A eutanásia foi realizada com o anestésico inalatório isoflurano, seguido de punção cardíaca.

O sangue foi coletado para análise de hemograma e enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Tecidos de pulmão, coração, fígado, baço, rim, gastrocnêmio foram coletados para análises histológicas e de Western Blott que serão realizadas posteriormente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os machos tratados com MCT apresentaram redução significativa do peso corporal ao final do período experimental em relação ao peso inicial ($p < 0,0027$). Esse mesmo grupo mostrou peso menor em relação ao grupo Controle após 3 semanas ($p < 0,0001$).

Esta redução de peso também foi encontrada em camundongos C57BL/6, em estudos feitos com a mesma dose de MCT, entretanto após maior tempo experimental, com oito semanas (VINKE et al., 2019) e seis semanas (BOWEN et al., 2017) de indução consecutiva com utilização de via subcutânea.

No 5º dia experimental, após o início da administração de MCT, tivemos o óbito de um animal (macho). No 12º dia tivemos o óbito de quatro animais, sendo duas fêmeas e dois machos. Com isso, a curva de sobrevivência mostra que aproximadamente metade dos machos morreu após a segunda administração de MCT, enquanto que nas fêmeas a mortalidade foi de aproximadamente 20% no mesmo período. Não foram registrados óbitos dos animais dos grupos controle.

Nas análises sanguíneas, não observamos alterações significativas no hemograma entre os grupos estudados. No exame AST houve diferença significativa ($p = 0,0139$) entre os grupos controle fêmeas e controle machos. Já a ALT foi significativamente diferente entre os grupos controle fêmeas e MCT fêmeas ($p < 0,05$).

4. CONCLUSÕES

A avaliação de uma via de absorção mais rápida poderia gerar nos animais o remodelamento obstrutivo pulmonar e remodelamento cardíaco em menos tempo de tratamento e com menos recursos utilizados. Chegando no objetivo que almejamos que é mimetizar a HAP.

Devido a mortalidade dos animais o fim do experimento foi antecipado, com isso utilizaremos os resultados que tivemos até então, juntamente com as análises histológicas e de Western Blott para complementarmos o nosso entendimento sobre este estudo. Diante do exposto, utilizaremos estas respostas para minimizar a utilização de animais e termos embasamento para projetos futuros dentro do nosso grupo de pesquisa, além de diminuir os custos durante a indução e tratamento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- YAN, C. C.; HUXTABLE, R. J. Effect of the pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline, on bile composition of the isolated, perfused rat liver. **Life Sciences**, v. 57, n. 6, p. 617–626, 30 jun. 1995.
- ZIMMER, A. et al. Thioredoxin system activation is associated with the progression of experimental pulmonary arterial hypertension. **Life Sci.**, 1;(284):119917, 2021.
- LUDKE, A. R. L. et al. Modulation of Monocrotaline-Induced Cor Pulmonale by Grape Juice. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 55, n. 1, p. 89–95, 1 jan. 2010.
- VINKE, Paulien et al. Anti-inflammatory nutrition with high protein attenuates cardiac and skeletal muscle alterations in a pulmonary arterial hypertension model. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 10160, 2019.
- BOWEN, Thomas Scott et al. Small-molecule inhibition of MuRF1 attenuates skeletal muscle atrophy and dysfunction in cardiac cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 8, n. 6, p. 939-953, 2017.
- AHN, Bumsoo et al. Atrofia do diafragma e disfunção contrátil em um modelo murino de hipertensão pulmonar. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e62702, 2013.
- NISHII, Y. et al. Protective role of protein C inhibitor in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, n. 11, p. 2331-2339, 2006.
- SETA, Francesca et al. Pulmonary oxidative stress is increased in cyclooxygenase-2 knockdown mice with mild pulmonary hypertension induced by monocrotaline. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. 23439, 2011.
- RIBEIRO, Edlene Lima et al. Diethylcarbamazine: A potential treatment drug for pulmonary hypertension? **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 333, p. 92-99, 2017.
- MONTANI, David et al. Hipertensão arterial pulmonar. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 8, p. 1-28, 2013.
- LAU, Edmund MT et al. Epidemiologia e tratamento da hipertensão arterial pulmonar. **Nature Reviews Cardiology**, v. 14, n. 10, p. 603-614, 2017.
- LAN, Norris S. H. et al. **Pulmonary arterial hypertension: pathophysiology and treatment**. Diseases, v. 6, n. 2, p. 38, maio 2018.
- WILSON, D. W. et al. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, 22;(5–6):307–325, 1992.