

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 Blot 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.