

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA PROTEÍNA HMGB1 (HIGH MOBILITY GROUP BOX-1) NOS NÚCLEOS SUPRAÓTICOS NA SEPSE.

Diego Santos de Oliveira¹; Dayane Aparecida Gomes²

¹Estudante do Curso de Fisioterapia - CCS – UFPE; E-mail: oliveirads@hotmail.com.br,

²Docente/pesquisador do Depto de Fisiologia e Farmacologia – CCB – UFPE. E-mail: dayane.gomes@ufpe.br

Sumário: A sepse é uma síndrome grave com elevada mortalidade para o ser humano. Na fase avançada do choque séptico, os níveis de HMGB1 são significativamente mais baixos que na sepse grave, bem como os de vasopressina. **Objetivo:** avaliar a expressão gênica e proteica da proteína HMGB1 (High mobility group Box-1) nos núcleos supraóticos na sepse experimental. **Metodologia:** Os animais foram divididos em dois grupos: ligadura e punção do ceco (grupo CLP) e o grupo falso operado (grupo *Sham*). Foram realizadas as análises hematológicas, bioquímicas, expressão proteica e dos níveis glicêmicos dos animais. **Resultados:** Neste estudo não se observou mudanças no eritrograma nos níveis plasmáticos de albumina, proteína total e creatinina. Os dados mostram que os efeitos dos anestésicos ketamina (k) e xilazina (x) promovem hiperglicemia, observou-se aumento de 97% dos níveis da glicemia imediatamente após a eutanásia, quando comparado o grupo Sham pré e pós-anestésico. Este mesmo perfil aconteceu com o grupo CLP, demonstrando aumento do nível glicêmico em 115,1%. Não se observou diferença significativa na glicemia nos animais pré e pós-anestesiados transcorridas 4 horas de cirurgia, tanto no grupo Sham quanto no grupo CLP. As análises de expressão proteica estão em andamento para concluir o objeto de estudo deste trabalho.

Palavras-chave: HMGB-1; Neuroendocrinologia; Sepse; Vasopressina.

INTRODUÇÃO

A sepse é uma síndrome grave com elevada mortalidade para o ser humano e figura como a terceira causa de morte no Brasil (Silva *et al.*, 2004). O sucesso dos mecanismos de defesa durante a sepse depende da “sintonia” entre os sistemas autonômico, imune e neuroendócrino. A hipófise é uma glândula essencial na recuperação da homeostase durante a sepse e representa a junção do sistema nervoso central e o sistema endócrino periférico (Giusti-Paiva *et al.*, 2010). Durante a sepse, a hipófise posterior é ativada por citocinas pró-inflamatórias via barreira hematoencefálica e através de uma interação complexa do sistema nervoso autônomo e células imunes, estimulando a secreção de vasopressina em uma primeira fase aguda, da qual é acompanhada de uma redução da síntese e secreção deste peptídeo na fase tardia da sepse, o qual é consequência de uma resposta neurohipofisária anormal. A redução da secreção de vasopressina contribui para a instalação do estado de choque, progressão da inflamação com subsequente falência múltipla de órgãos e morte (Kampmeier, *et al.*, 2010; Giusti-Paiva *et al.*, 2010) O sistema hipotálamo neurohipofisário (SNH) está localizado na porção média do hipotálamo anterior e compreende dois núcleos paraventricular (PVN) de cada lado da parede dorsolateral do terceiro ventrículo e dois núcleos supraóticos (SON) (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004). A vasopressina é sintetizada por neurônios magnocelulares no hipotálamo e armazenada em neurônios que terminam na hipófise posterior. Em resposta a despolarização da membrana excitada por impulsos elétricos gerados no SON e PVN o

hormônio é secretado na circulação sistêmica pelo processo de exocitose. Em geral, o processo completo de síntese de AVP, transporte e armazenamento na hipófise posterior, leva entre 1-2 horas. No plasma, a meia-vida da vasopressina é curta, cerca de 5-15 minutos. Assim, a concentração plasmática reflete a liberação recente de vasopressina (Mutlu & Factor, 2004). A secreção de vasopressina exibe um padrão bifásico durante a sepse tanto em animais como em seres humanos (Giusti-Paiva *et al.*, 2003; Giusti-Paiva & Santiago, 2010). Primeiro, a secreção de vasopressina é caracterizada por aumento significativo na fase inicial da sepse; e segundo, na fase tardia, os níveis de vasopressina são contraditoriamente baixos para o grau de hipotensão (Giusti-Paiva *et al.*, 2002). Na sepse grave que evolui para o choque séptico, a disfunção neurohipofisária tem sido descrita como fator crucial responsável pela instalação do quadro de choque (Kampmeier, *et al.*, 2010; Giusti-Paiva *et al.*, 2010). A HMGB1 (*High mobility group Box-1*) é uma proteína abundante no núcleo da célula, sua função dentro do núcleo se limita à estabilização da estrutura do nucleossomo e a facilitação da transcrição gênica, o que a torna um importante promotor da homeostase nuclear. Em um contexto de lesão celular, ou quando a célula é exposta a agentes inflamatórios, a HMGB1 sai dos domínios do núcleo e ganha o ambiente extracelular. A sinalização da HMGB1 ocorre através de sua ligação com receptores como RAGE (*Receptor for Advanced Glycation Endoprodukt*), TLR2 (*Toll-like Receptor-2*) e TLR4 (*Toll-like Receptor-4*). A ativação destes receptores resulta na ativação do NF- κ B (Nuclear Factor kappa B), conhecido por amplificar a resposta pró-inflamatória das citocinas. A HMGB1 exerce papel decisivo na sepse grave. Tradicionalmente os níveis plasmáticos da HMGB1 se elevam mais tardiamente na sepse, cerca de dezesseis horas após o pico das citocinas de fase mais precoce como a IL-1 β e o TNF- α (O'Connor *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2008). Baseado nestes dados, a HMGB1 passou a ser implicada como protagonista da sepse grave, sobretudo numa fase avançada da doença (Wang *et al.*, 1999; Sunden-Cullberg *et al.*, 2006) e isto foi demonstrado tanto em modelos animais quanto em seres humanos, num momento em que a doença seria irreversível com as opções terapêuticas disponíveis na atualidade (Deutschman *et al.*, 2013). Neste cenário, a HMGB1 comportar-se-ia como um marcador de mortalidade na sepse, cujos mecanismos de ação, inclusive no SNC, ainda merecem estudos adicionais. Adicionalmente, é de grande importância investigar a relação sepse com a expressão de HMGB1 nos núcleos que regulam a síntese e secreção de vasopressina. Nossa hipótese é se a sepse experimental pode modular a expressão proteica da HMGB1 nos núcleos supraópticos? Nosso objetivo é investigar a participação da HMGB1 como modulador dos neurônios vasopressinérgicos em ratos normais e durante a sepse experimental e investigar a expressão gênica e proteica da HMGB1 nos núcleos supraópticos durante o desenvolvimento da sepse experimental.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, pesando entre 200 e 250g fornecidos pelo Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE. A sepse foi induzida conforme descrito previamente (Lira *et al.*, 2007). Resumidamente, os ratos foram anestesiados com uma mistura de quetamina (100 mg/Kg peso corpóreo) e xilazina (60mg/Kg de peso corpóreo). No fim da cirurgia, os animais receberam, no dorso, 10% do seu peso em salina 0,9% por via subcutânea para evitar a hipovolemia e choque séptico (cirurgia de ligadura e punção de ceco, **grupo CLP**). O grupo controle foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico de abertura da cavidade abdominal e manipulação intestinal sem ocorrer neste a perfuração e punção do ceco (cirurgia fictícia, **grupo Sham**). Os animais foram divididos em dois grupos: ligadura e punção do ceco (grupo CLP) e o grupo falso operado (grupo *Sham*). Após a cirurgia os

animais foram monitorados e eutanasiados nos tempos: 0, 2, 4h. **ANÁLISES HEMATOLÓGICAS:** Após a decapitação dos animais, o sangue total foi coletado do tronco em tubo para coleta de sangue contendo heparina. Cem microlitros do sangue serão utilizados para análise no contador de células SDH-20 (Labtest). **ANÁLISE BIOQUÍMICA:** O sangue total foi coletado após o processo de decapitação com posterior coleta do sangue direto do tronco do animal em tubo para coleta de sangue sem heparina (BD Vacutainer®). **AVALIAÇÃO DO PERFIL GLICÊMICO PRÉ E PÓS ANESTESIA:** Foram quantificados os níveis glicêmicos em dois momentos: 1) imediatamente antes da anestesia com o animal acordado e 2) imediatamente antes da decapitação, tendo transcorrido 0 horas, 2 horas e 4 horas após o término do processo cirúrgico em ambos os grupos Sham e CLP. **ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA:** Para a coleta dos núcleos supraópticos, os cérebros foram prontamente retirados dos crânios de ratos decapitados, e os núcleos supraópticos foram microdissecados bilateralmente a partir do fundo do encéfalo usando o quiasma como referência. Os núcleos supraópticos de ambos os lados de cada encéfalo foi reunido num tubo único.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo não se observou mudanças no eritrograma, não apresentando diferenças significativas quanto à contagem de hemoglobina, eritrócitos e o percentual de hematócritos. Estes valores podem ser justificados devido à coagulação do sangue total para análise hematológica, durante sua coleta. Acreditamos que este problema seja devido ao processo de decapitação com posterior coleta do sangue direto do tronco do animal (sangue arterial misturado ao sangue venoso). Os níveis plasmáticos albumina, proteína total e creatinina, não apresentaram significância estatística. Nossos resultados mostram os efeitos dos agentes anestésicos, comumente usados em modelos animais, sobre os níveis de glicose no sangue em ratos alimentados induzidos a cirurgias Sham e CLP. Observou-se aumento de 97% dos níveis da glicemia em zero hora, quando comparado o grupo Sham pré e pós anestésico. Este mesmo perfil aconteceu com o grupo CLP zero hora, demonstrando aumento do nível glicêmico em 115,1%. Nota-se que os níveis glicêmicos mantem-se aumentados com 2 horas pós-anestesia tanto no grupo Sham (+69,3%) quanto no grupo CLP (+131,0%). Não se observou diferença significativa na glicemia nos animais pré e pós-anestesiados com 4 horas de cirurgia, tanto no grupo Sham quanto no grupo CLP. Diante da atual conjuntura financeira do país a instituição (UFPE) não concedeu recursos para pagamento de diárias e passagens para que a expressão gênica da HMGB1 fosse realizada em parceria com o Laboratório de Biologia Celular. Outro agravante para nosso laboratório é que as agências de fomento (FACEPE e CNPq) não depositaram os recursos dos projetos aprovados atrasando o que atrasou a implementação desta técnica no Laboratório de Neuroendocrinologia e Metabolismo.

CONCLUSÕES

Em conclusão, a sepse experimental não determinou alterações no eritrograma, nos níveis plasmáticos de albumina, proteína total e creatinina. Observamos que os anestésicos ketamina (k) e xilazina (x) promovem hiperglicemia que diminui com decorrer do tempo devido sua metabolização hepática e renal. Estudos adiconais devem ser empregados para elucidar os eventos que ocorrem na sepse e que envolvam a HGMB-1, tornando-se necessária a analises da expressão proteica, que encontra-se em andamento para concluir o objeto de estudo deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq, CAPES, FACEPE e UFPE pelo suporte ao desenvolvimentos desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- DEUTSCHMAN CS, RAJ NR, MCGUIRE EO, KELZ MB. **Orexinergic Activity Modulates Altered Vital Signs and Pituitary Hormone Secretion in Experimental Sepsis.** *Crit Care Med.* 41(11):e368-75, 2013.
- ANTUNES-RODRIGUES J, DE CASTRO M, ELIAS LL, VALENÇA MM, MCCANN SM. **Neuroendocrine control of body fluid metabolism.** *Physiol Rev.* Jan;84(1):169-208, 2004.
- GIUSTI-PAIVA, A; SANTIAGO, MB. **Neurohypophyseal Dysfunction During Septic Shock.** *Endocr Metab Immune Disrord Drug Targets;* 10:247-251, 2010.
- GIUSTI-PAIVA A, RUGINSK SG, DE CASTRO M, ELIAS LL, CARNIO EC, ANTUNES-RODRIGUES J. **Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced release of vasopressin in rats.** *Neurosci Lett.* Jul 31;346(1-2):21-4, 2003.
- KAMPMEIER, TG; REHBERG, S; WHESTEPHAL, M; LANGE, M. **Vasopressin in Sepsis and Septic Shock.** *Minerva Anesthesiol;* 76(10):844-50, 2010.
- LIRA EC, GRACA FA, GONCALVES DA, ZANON NM, BAVIERA AM, STRINDBERG L, LÖNNROTH P, MIGLIORINI RH, KETTELHUT IC, NAVEGANTES LC. **Cyclic adenosine monophosphate-phosphodiesterase inhibitors reduce skeletal muscle protein catabolism in septic rats.** *Shock.* Jun;27(6):687-94, 2007.
- MUTLU GM, FACTOR P. **Role of vasopressin in the management of septic shock.** *Intensive Care Med.* Jul;30(7):1276-91, 2004.
- O'CONNOR KA, HANSEN MK, RACHAL PUGH C, DEAK MM, BIEDENKAPP JC, MILLIGAN ED, JOHNSON JD, WANG H, MAIER SF, TRACEY KJ, WATKINS LR. **Further Characterization of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) as a Proinflammatory Cytokine: Central Nervous System Effects.** *Cytokine;* 24:254-265, 2003.
- SILVA, E; PEDRO, MA; SOGAYAR, ACB. **Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study).** *Critical Care;* 8:R251-R260, 2004.
- SUNDEN-CULLBERG, J; NORRBY-TEGLUND, A; TREUTIGER, C.J. **The Role of High Mobility Goup Box-1 protein in Severe Sepsis.** *Curr Opin Infect Dis.;* 19:231-236, 2006..
- TANG Y, LV B, WANG H, XIAO X, ZUO X. **PACAP Inhibit the Release and Cytokine Activity of HMGB1 and Improve the Survival During Lethal Endotoxemia.** *Int. Immunopharmacol;* 8:1646-1651, 2008.