

Tratamento com lodenafila no modelo de hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina em ratos*

Lodenafil treatment in the monocrotaline model
of pulmonary hypertension in rats

Igor Bastos Polonio, Milena Marques Pagliareli Acencio, Rogério Pazetti,
Francine Maria de Almeida, Bárbara Soares da Silva,
Karina Aparecida Bonifácio Pereira, Rogério Souza

Resumo

Avaliamos os efeitos da lodenafila na hemodinâmica e inflamação no modelo experimental de hipertensão pulmonar (HP) induzida por monocrotalina em ratos. Trinta ratos Sprague-Dawley foram randomicamente distribuídos em três grupos: controle, monocrotalina (modelo experimental) e lodenafila (modelo experimental e tratado com 5 mg/kg lodenafila v.o. por 28 dias). A pressão média de artéria pulmonar (PAPm) foi obtida por cateterismo cardíaco direito. Foram determinados a hipertrofia ventricular direita (HVD) e os níveis de IL-1 em fragmentos de pulmão. O grupo monocrotalina apresentou valores significativamente maiores de PAPm, HVD e IL-1 em comparação aos grupos controle e lodenafila. Concluímos que a lodenafila pode prevenir o desenvolvimento de HP, HVD e inflamação.

Descritores: Hipertensão pulmonar; Monocrotalina; Interleucina-1.

Abstract

We assessed the effects of lodenafil on hemodynamics and inflammation in the rat model of monocrotaline-induced pulmonary hypertension (PH). Thirty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: control; monocrotaline (experimental model); and lodenafil (experimental model followed by lodenafil treatment, p.o., 5 mg/kg daily for 28 days) Mean pulmonary artery pressure (mPAP) was obtained by right heart catheterization. We investigated right ventricular hypertrophy (RVH) and IL-1 levels in lung fragments. The number of cases of RVH was significantly higher in the monocrotaline group than in the lodenafil and control groups, as were mPAP and IL-1 levels. We conclude that lodenafil can prevent monocrotaline-induced PH, RVH, and inflammation.

Keywords: Hypertension, pulmonary; Monocrotaline; Interleukin-1.

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença de prognóstico reservado, que se caracteriza por proliferação de células endoteliais, hipertrofia e proliferação de células musculares da camada média das artérias pulmonares, redução do lúmen vascular e desenvolvimento de lesões plexiformes. A redução do lúmen vascular leva ao aumento da resistência vascular pulmonar, causando hipertrofia de ventrículo direito (VD), *cor pulmonale* e morte. Além disso, a HAP é um problema de saúde pública, já que a esquistossomose, uma de suas causas, assume proporções epidêmicas em países em desenvolvimento.^(1,2)

O tratamento da HAP é complexo e de alto custo, assim como exige uma equipe

multidisciplinar. Existem três principais vias fisiopatológicas, para as quais fármacos específicos para o tratamento estão disponíveis: a via da endotelina, a via do óxido nítrico e a via da prostaglandina.⁽¹⁾ Essas vias foram descobertas através de modelos experimentais de HP, sendo o principal representante o modelo de monocrotalina. Através desse modelo, muitas das drogas disponíveis para o tratamento da HAP foram testadas.⁽³⁾

O modelo de monocrotalina é simples, barato e factível, sendo rotineiramente utilizado na análise inicial de fármacos com potencial ação na circulação pulmonar. A monocrotalina é um alcaloide derivado das sementes da planta *Crotalaria*

*Trabalho realizado na Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

Endereço para correspondência: Igor Bastos Polonio. Rua Monte Alegre, 47, Perdizes, CEP 05014-000, São Paulo, SP, Brasil. Tel. 55 11 3862-5081. E-mail: igbpolonio@yahoo.com.br

Apoio financeiro: Este estudo recebeu apoio financeiro pelo fornecimento do sal da lodenafila da empresa Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.

Recebido para publicação em 13/04/2014. Aprovado, após revisão, em 18/6/2014.

spectabilis, que, após a oxidação hepática, gera seu metabólito tóxico que provocará vasculite e espessamento da camada média das artérias e arteríolas pulmonares.⁽⁴⁾ Após 22 dias da injeção da substância já temos uma HP importante.⁽⁵⁾

O carbonato de lodenafila é um novo inibidor da fosfodiesterase 5, constituído por duas moléculas de lodenafila ligadas por uma ponte de carbonato que se comporta como uma pró-droga, liberando a lodenafila como metabólito ativo. Sua segurança já está bem estabelecida para o tratamento da disfunção erétil em estudos pré-clínicos e clínicos; porém, nunca foi testada para a HAP.⁽⁶⁾

O objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta à administração de lodenafila, do ponto de vista hemodinâmico e inflamatório, no modelo experimental de HAP induzida por monocrotalina.

Todos os animais receberam tratamento digno em concordância com normas internacionais de cuidados com os animais.⁽⁷⁾ O estudo teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na cidade de São Paulo (SP).

Trinta ratos Sprague-Dawley machos, com peso entre 250 e 300 g, foram randomicamente distribuídos em três grupos: grupo controle – os animais receberam uma injeção subcutânea de salina (1 mL/kg) no dia de início do estudo (D0) – grupo monocrotalina – os animais receberam uma injeção subcutânea de monocrotalina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) no D0 do estudo (60 mg/kg) – e grupo lodenafila – os animais receberam uma injeção subcutânea de monocrotalina (Sigma-Aldrich) no D0 do estudo (60 mg/kg) e, entre o D0 e o dia 28 do estudo (D28), os animais receberam lodenafila v.o. (5 mg/kg) uma vez ao dia.

No D28, após sedação profunda – com cloridrato de xilazina i.p. (0,3 mg/kg; Rompun®; Bayer, Leverkusen, Alemanha) e cloridrato de cetamina i.p. (10 mg/kg); Ketalar®; Pfizer, New York, NY, EUA) – os animais foram inicialmente pesados para depois serem realizadas as medidas hemodinâmicas, seguidas do sacrifício dos animais através de sangria da aorta abdominal e, por fim, a coleta de tecidos cardíaco e pulmonar.

As medidas hemodinâmicas foram realizadas através da inserção pela veia jugular externa de um cateter umbilical conectado a um transdutor de pressão HP1295C (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EUA) ligado a um monitor hemodinâmico

modelo Monitox Dx 2020 (Hewlett-Packard), seguindo a técnica descrita em um estudo anterior.⁽⁸⁾ A pressão média da artéria pulmonar (PAPm) foi obtida através desse sistema.

O VD foi dissecado do ventrículo esquerdo (VE), o qual, por sua vez, manteve o septo interventricular (VE+S). A razão entre o peso do VD e o peso do conjunto VE+S, ou seja, VD/(VE+S), foi utilizada como um marcador de hipertrofia de VD.⁽⁸⁾

Para a análise da inflamação, foi determinada a concentração de IL-1 por ELISA de captura utilizando-se o kit comercial de IL-1 (R&D System Inc., Minneapolis, MN, EUA).⁽⁹⁾ O peptídeo foi dosado a partir de fragmentos de pulmão congelados.

Quanto à análise estatística, as variáveis contínuas foram comparadas, entre os diferentes grupos, através de ANOVA e análise *post hoc* com correção de Bonferroni. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

O grupo monocrotalina desenvolveu HAP, como mostram as Figuras 1 e 2, com aumento significativo da PAPm e hipertrofia de VD.

O grupo lodenafila apresentou PAPm significativamente menor do que o grupo monocrotalina, sem diferença significativa quando comparado ao grupo controle, ou seja, a lodenafila preveniu o desenvolvimento de HAP (Figura 1). O mesmo padrão foi observado em relação ao remodelamento do VD e aos níveis de IL-1 (Figura 2).

Até onde sabemos, o presente estudo é o primeiro a demonstrar que a lodenafila foi capaz de prevenir o desenvolvimento de HAP no modelo experimental induzido com monocrotalina.

É evidente que os modelos experimentais em HAP não mimetizam adequadamente a doença que ocorre em seres humanos. Vários

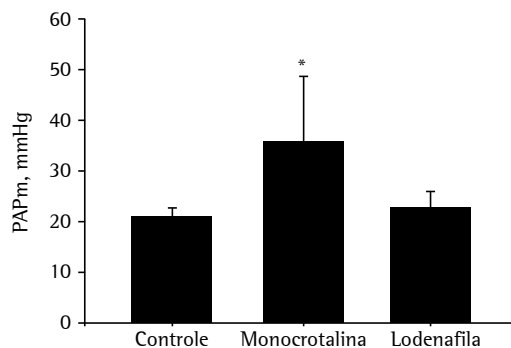


Figura 1 – Pressão média da artéria pulmonar (PAPm) nos grupos estudados. * $p = 0,001$ (grupo monocrotalina vs. grupos controle e lodenafila).

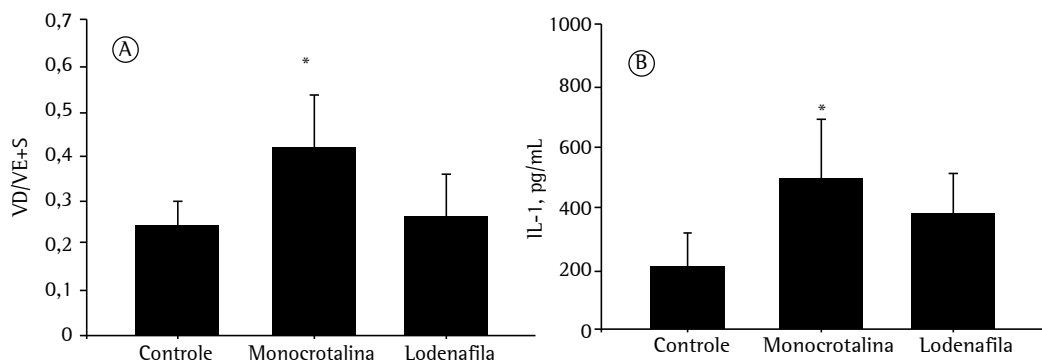


Figura 2 – Hipertrofia de ventrículo direito (VD) e níveis de IL-1 nos grupos estudados. Em A, a hipertrofia do VD foi determinada pela razão entre o peso do VD e o peso do ventrículo esquerdo + septo (VE+S). Em B, níveis de IL-1 por ELISA. *p < 0,001 (grupo monocrotalina vs. grupos controle e lodenafila para ambos os gráficos).

são os motivos que podem estar relacionados a essa limitação, desde o tempo necessário para instalação da HAP, ao longo de anos nos seres humanos e de forma rapidamente progressiva nos modelos animais, assim como características específicas dos métodos utilizados para indução da HAP.⁽⁵⁾ Especificamente no modelo induzido por monocrotalina, há um aspecto inflamatório muito significativo, não observado nas principais formas de HAP em humanos.⁽⁴⁾ Isso explica o porquê de vários fármacos terem um efeito marcante em diversos modelos experimentais e não apresentarem os mesmos resultados em seres humanos, enfatizando o cuidado que deve ser tomado antes de se extrapolar resultados oriundos de modelos experimentais diretamente para a prática clínica.

Especificamente para avaliar o caráter inflamatório do modelo de monocrotalina, assim como as potenciais propriedades anti-inflamatórias da lodenafila, foram determinados os níveis de IL-1 no tecido pulmonar. O achado de níveis de IL-1 semelhantes aos do grupo controle nos ratos tratados com lodenafila sugere que a lodenafila tenha inibido a cascata inflamatória característica do modelo de monocrotalina. O mecanismo direto dessa inibição não foi objeto de nosso estudo, caracterizando uma limitação do mesmo.

A sobrevida de ratos tratados com monocrotalina é significativamente menor, conforme um estudo publicado anteriormente,⁽⁸⁾ de forma paralela ao progressivo acometimento vascular e do VD. O mesmo pode ser observado em relação a seres humanos com HAP, que apresentam sobrevida diminuída devido ao

desenvolvimento de remodelamento vascular pulmonar associado à falência progressiva do VD, sendo essa a principal causa de morte em pacientes com HAP.⁽²⁾ Nosso estudo demonstrou que a lodenafila preveniu a elevação da PAPm, assim como o remodelamento do VD nos ratos com HAP em decorrência da monocrotalina. Embora não tenhamos avaliado o papel da lodenafila na reversão da HAP já estabelecida, nosso estudo evidencia o potencial terapêutico da lodenafila na HAP, de forma análoga ao já demonstrado para outros inibidores de fosfodiesterase.⁽³⁾

Em conclusão, a lodenafila preveniu o desenvolvimento de HAP e o remodelamento do VD em ratos submetidos a um modelo experimental de HAP. Nossos achados fornecem a primeira base para o desenvolvimento de estudos clínicos avaliando o potencial da lodenafila no tratamento da HAP em seres humanos.

Referências

1. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Diretrizes Brasileiras para manejo da hipertensão pulmonar. *J Bras Pneumol.* 2005;31(Suppl 2):S1-S31.
2. Hoette S, Jardim C, Souza Rd. Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: an update. *J Bras Pneumol.* 2010;36(6):795-811. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132010000600018>
3. Schermuly RT, Kreiselmeier KP, Ghofrani HA, Yilmaz H, Butrous G, Ermert L, et al. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169(1):39-45. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200302-2820C>
4. Price LC, Montani D, Tcherakian C, Dorfmueller P, Souza R, Gambaryan N, et al. Dexamethasone reverses monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Eur Respir J.* 2011;37(4):813-22. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00028310>

5. Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Dunston SK. Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res.* 1989;38(1):57-80. [http://dx.doi.org/10.1016/0026-2862\(89\)90017-4](http://dx.doi.org/10.1016/0026-2862(89)90017-4)
6. Silva AC, Toffoletto O, Lucio LA, Santos PF, Afione JB, Massud Filho J, et al. Repercussão cardiovascular, com e sem álcool, do carbonato de lodenafila, um novo inibidor da PDE5. *Arq Bras Cardiol.* 2010;94(2):160-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2010000200004>
7. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the care and use of laboratory animals.* 8th ed. Washington D.C.: National Academic Press; 2011.
8. Polonio IB, Acencio MM, Pazetti R, Almeida FM, Canzian M, Silva BS, et al. Comparison of two experimental models of pulmonary hypertension. *J Bras Pneumol.* 2012;38(4):452-60. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132012000400007>
9. Acencio MM, Vargas FS, Marchi E, Carnevale GG, Teixeira LR, Antonangelo L, et al. Pleural mesothelial cells mediate inflammatory and profibrotic responses in talc induced pleurodesis. *Lung.* 2007;185(6):343-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s00408-007-9041-y>

Sobre os autores

Igor Bastos Polonio

Professor Doutor. Disciplina de Pneumologia, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

Milena Marques Pagliareli Acencio

Pesquisadora Doutora. Laboratório de Pleura, Disciplina de Pneumologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

Rogério Pazetti

Pesquisador Doutor. Laboratório de Investigação Médica 61 (LIM-61), Disciplina de Cirurgia Torácica, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

Francine Maria de Almeida

Pesquisadora Mestre. Laboratório de Investigação Médica 61 (LIM-61), Disciplina de Cirurgia Torácica, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

Bárbara Soares da Silva

Pesquisadora. Laboratório de Pleura, Disciplina de Pneumologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

Karina Aparecida Bonifácio Pereira

Pesquisadora. Laboratório de Pleura, Disciplina de Pneumologia, Faculdade de Medicina, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

Rogério Souza

Professor Associado Livre-Docente. Disciplina de Pneumologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.