



Artigo Original

Expressão de citocinas plasmáticas após compressão de membros inferiores de ratos[☆]



Mauricio Wanderley Moral Sgarbi^{a,*}, Bomfim Alves Silva Júnior^a,
Carmem Maldonado Peres^a, Tatiana Carolina Alba Loureiro^a,
Rui Curi^a, Francisco Garcia Soriano^a, Daniel Araki Ribeiro^b e Irineu Tadeu Velasco^a

^a Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

^b Departamento de Biociências, Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), São Paulo, SP, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 11 de outubro de 2013

Aceito em 23 de janeiro de 2014

On-line em 1 de agosto de 2014

Palavras-chave:

Síndrome de esmagamento

Modelos animais

Interleucinas

Fator de necrose tumoral α

R E S U M O

Objetivos: a lesão muscular por esmagamento (lesão por compressão muscular) está associada a manifestações sistêmicas conhecidas como síndrome do esmagamento. A reação inflamatória sistêmica pode também ser desencadeada pela lesão muscular isolada. O objetivo deste estudo foi investigar os níveis plasmáticos de interleucinas (IL) 1, 6, 10 e TNF- α , marcadores de uma possível reação inflamatória sistêmica, após a lesão muscular isolada resultante da compressão de membros inferiores de ratos.

Métodos: ratos Wistar machos foram submetidos a uma hora de compressão dos membros inferiores por uma faixa de borracha. Os níveis plasmáticos de IL 1, 6, 10 e TNF- α foram medidos uma, duas e quatro horas após a liberação da compressão.

Resultados: os níveis plasmáticos de IL 10 diminuíram quando comparados com outros grupos com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Não houve detecção, pelo método, da presença de IL 1, 6 e TNF- α .

Conclusão: nossos resultados demonstraram que as alterações dos níveis plasmáticos de IL 10 encontradas podem ser um sinal da presença de interleucinas circulantes nesse modelo de compressão de membros inferiores de ratos.

© 2014 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Plasma cytokine expression after lower-limb compression in rats

A B S T R A C T

Objectives: muscle injury due to crushing (muscle compression injury) is associated with systemic manifestations known as crush syndrome. A systemic inflammatory reaction may also be triggered by isolated muscle injury. The aim of this study was to investigate

Keywords:

Crush syndrome

Animal models

[☆] Trabalho desenvolvido na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: moralsgarbi@yahoo.com.br (M.W.M. Sgarbi).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbo.2014.01.018>

0102-3616/© 2014 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Interleukins
Tumor necrosis factor α

the plasma levels of interleukins (IL) 1, 6 and 10 and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), which are markers for possible systemic inflammatory reactions, after isolated muscle injury resulting from lower-limb compression in rats.

Methods: male Wistar rats were subjected to one hour of compression of their lower limbs by means of a rubber band. The plasma levels of IL 1, 6 and 10 and TNF- α were measured one, two and four hours after the rats were released from compression.

Results: the plasma levels of IL 10 decreased in relation to those of the other groups, with a statistically significant difference ($p < 0.05$). The method used did not detect the presence of IL 1, IL 6 or TNF- α .

Conclusion: our results demonstrated that the changes in plasma levels of IL 10 that were found may have been a sign of the presence of circulating interleukins in this model of lower-limb compression in rats.

© 2014 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

Está bem estabelecido que o trauma musculoesquelético está associado a uma importante resposta inflamatória mediada por um complexo sistema biológico de mediadores químicos.¹ Tais mecanismos estão presentes nas lesões musculares.² Além da resposta inflamatória local, órgãos distantes estão sujeitos aos efeitos desses mediadores.³ A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) é uma complicação grave desse processo.^{1,4}

A síndrome de esmagamento (SE) é a repercussão sistêmica das lesões musculares, especialmente quando os membros inferiores são afetados.⁵ O tipo de lesão muscular associado à SE ocorre por compressão, como na situação de vítimas sob escombros. Classicamente há um extravasamento de mioglobina na circulação, com repercussões renais e em muitos casos a insuficiência renal.⁶ Outros mecanismos relacionados com a SE têm sido estudados, com especial interesse na resposta inflamatória.^{7,8}

Citoquinas são mediadores químicos estudados na inflamação e na SIRS. Agem como fatores quimiotáticos para células inflamatórias, como neutrófilos, e são capazes de promover repostas clínicas sistêmicas, como dor e febre.⁹ A produção de citocinas anti-inflamatórias ocorre simultaneamente durante o processo e diminui ou até cessa a inflamação.¹⁰ Atualmente, diversas citocinas são conhecidas. Dentre as mais estudadas, as interleucinas (IL) 1, 6 e TNF- α (fator de necrose tumoral α) caracterizam-se por estar fortemente associadas ao processo inflamatório e a IL 10 caracteriza-se pela função antagônica às anteriores, ou seja, ação anti-inflamatória. A proporção entre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias parece determinar a gravidade da resposta inflamatória.³

Recentemente desenvolvemos um modelo experimental para compressão de membros inferiores de ratos com as características de uma lesão muscular por esmagamento.⁸ Com o objetivo de contribuir para a compreensão da fisiopatologia da compressão muscular em nível celular e molecular, investigamos, neste artigo, se as citocinas plasmáticas estão presentes em ratos submetidos à compressão muscular dos membros inferiores em um modelo experimental que simule a lesão muscular por esmagamento.

Material e métodos

Após a aprovação do comitê de ética para pesquisa em animais, ratos Wistar adultos, com 250-300 g, $n = 24$, foram privados de comida, com acesso livre a água em um período de 12 horas antes dos experimentos. Sob anestesia geral (pentobarbital, intraperitoneal, 30 mg/kg e xilazina 2% intramuscular, 5 mg/kg), os animais foram mantidos em respiração espontânea no início dos experimentos. Após a estabilização clínica, 24 animais foram randomizados e divididos em quatro grupos ($n = 6$), de acordo com o tempo de sobrevida após liberação da compressão (uma hora, seis horas e quatro horas) ou grupo controle ($n = 6$). Uma faixa de borracha elástica (faixa de Esmarch) de 10 cm de largura e 80 cm de comprimento foi firmemente aplicada com 10 voltas sobre ambos os membros inferiores, de forma simultânea, pelo mesmo pesquisador (fig. 1). A pressão produzida pela faixa foi mensurada com valor de 300 mmHg, com o uso de uma variação do método de Whitesides, com a faixa ainda aplicada (fig. 2).¹¹ Após uma hora, a faixa foi retirada. Anestesia foi complementada quando necessário. De acordo com a prévia randomização, a eutanásia foi feita após uma, duas e quatro horas depois da retirada da faixa. Controles foram mantidos sob anestesia geral por quatro horas, sem compressão ou qualquer outro procedimento. A eutanásia foi feita com pentobarbital intraperitoneal (80 mg/kg) e amostras de sangue (2 mL) coletadas por punção do coração com agulha e seringa. O sangue retirado foi centrifugado imediatamente (4° C) e o plasma foi congelado (-80° C) para posterior análise das citocinas. O desenho experimental desse modelo foi estabelecido e previamente conduzido por nosso grupo de pesquisa.⁸

Expressão de interleucinas 1, 6, 10 e TNF- α

Amostras de sangue foram coletadas (2 mL) por punção cardíaca imediatamente antes da eutanásia. Foram centrifugadas por 10 minutos em 1.000 g (4° C) e o sobrenadante (aproximadamente 1 mL de plasma) foi colocado em tubos plásticos *eppendorf* a -80° C para análise posterior. A expressão de interleucinas 1, 6 e 10 e do TNF- α foi feita de acordo com as instruções do fabricante (PharMingen – OptEia®, BD

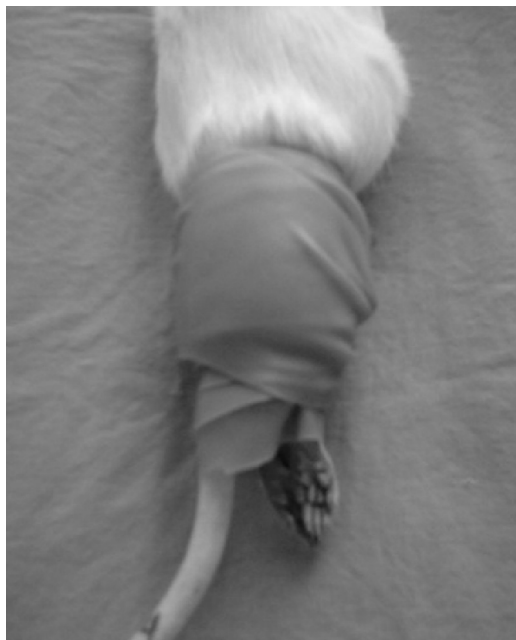


Figura 1 – Faixa de Esmarch aplicada com 10 voltas em torno dos membros inferiores.

Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Inicialmente, os poços da placa de leitura receberam o anticorpo específico (Biotinylated anti-rat IL 1, anti-rat IL 6, anti-rat IL 10 ou TNF- α monoclonal antibodies; PharMingen – OptEia[®]). As placas foram incubadas por 12 horas (4° C). Os poços foram lavados por cinco vezes com solução salina em tampão fosfato (PBS) com 0,05% Tween-20 (Polyoxyethylene sorbitan monooleate, Sigma[®], USA) (solução padrão). Depois, 200 μ L da solução salina em tampão fosfato (pH=7,0) com 10% de «soro fetal bovino» foram adicionados nas placas, que foram incubadas por 30 minutos a 4° C. Na sequência, as placas foram lavadas com a solução padrão. A primeira coluna da placa (oito poços) recebeu 100 μ L da solução do antígeno (IL 1, IL 6, IL 10 ou TNF- α) em diluições crescentes (PharMingen – OptEia[®]). A seguir, foram adicionados 100 μ L de cada uma das amostras nas células a partir da segunda coluna (a primeira coluna, como descrevemos, foi reservada para a construção da curva padrão de cada uma das interleucinas estudadas). Cada amostra foi estudada em duas células contíguas para que pudéssemos trabalhar com a média dos valores obtidos. O período de incubação nessa fase foi de duas horas e seguiu-se, novamente, a lavagem das células (cinco vezes) com a solução padrão. Anticorpos monoclonais ligados à biotina foram adicionados às placas monoclonais (Biotinylated anti-rat, PharMingen – OptEia[®]). Após incubação por uma hora, os poços foram novamente lavados com a solução padrão. Nessa fase, foram incorporados para cada poço 100 μ L de HRP (*horse radish peroxidase*) conjugada a avidina. As placas foram incubadas por 30 minutos e lavadas sete vezes com a solução padrão. Na fase final, foram adicionados 100 μ L de tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio. As placas foram incubadas por 30 minutos. Resultados finais foram obtidos com espectrofotometria (onda de 570 nm, para IL 1, IL 6 e IL 10 e onda de 450 nm para TNF α).

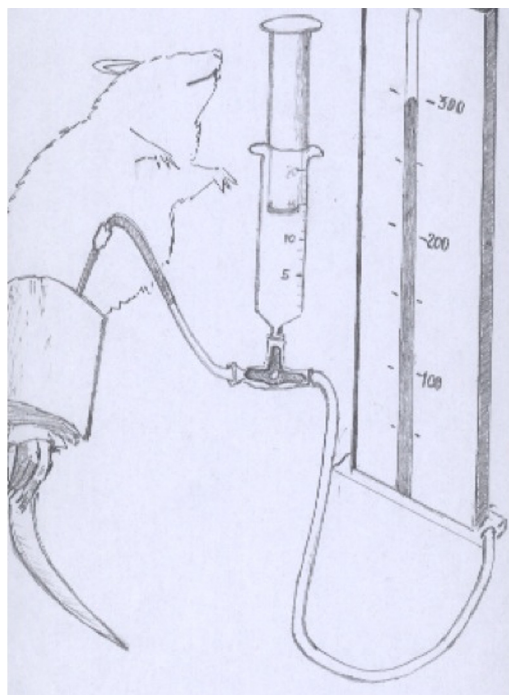


Figura 2 – Método de Whitesides modificado. Seringa preenchida com ar com o êmbolo tracionado com 15 mL conectada a uma «torneira de três vias», conectada a um tubo plástico com ar e a outro tubo preenchido até a metade com soro fisiológico. Tubo conectado a um esfigmomanômetro de mercúrio e o outro tubo conectado a uma agulha entre a pele e a faixa de Esmarch. Com a padronização de 10 voltas da faixa de Esmarch, a pressão necessária para deslocar o menisco líquido foi de 300 mmHg. Esquema do experimento (escalas não correspondem à realidade para melhor compreensão do método).

Análise estatística

A estatística foi analisada com o software SigmaStat[®] (SigmaStat for Windows Version 1.0, Copyright 1992-1994, Jandel Corporation). Foi usado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (*Anova by ranks test*) com os resultados descritos com a mediana e o intervalo interquartil. Na sequência, foram feitos pós-testes para comparação de pares nos grupos. Para tal, foi usado o teste t de Student-Newman-Keuls. Para comparar os pares após o teste de Kruskal-Wallis, foi usado o teste de Dunn.

Resultados

O plasma dos animais foi investigado para a presença de interleucinas pró-inflamatórias (IL 1, IL 6 e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL 10). Não foi detectada, para o limite do método usado, a presença das interleucinas pró-inflamatórias. Ao contrário, a IL 10 foi encontrada em todos os animais estudados e, após um aumento inicial, apresentou uma diminuição progressiva da sua concentração plasmática (fig. 1). As medianas obtidas foram 0,09 pg/mL (0,073-0,17 pg/mL) para o controle, 0,142 pg/mL (0,085-0,259 pg/mL) para

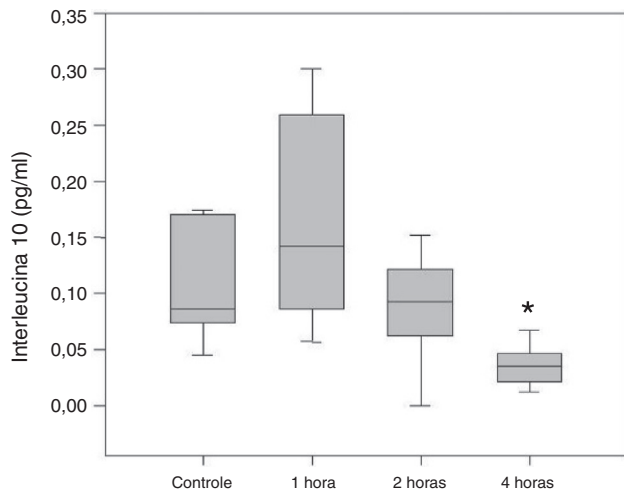


Figura 3 – Variações encontradas dos níveis plasmáticos de interleucina 10 durante o experimento.

* Significativo quando comparados os grupos após uma e quatro horas da liberação da compressão ($p < 0,05$).

uma hora, 0,09 pg/mL (0,061-0,121 pg/mL) para duas horas e 0,03 pg/mL (0,020-0,047 pg/mL) para quatro horas (Kruskal-Wallis Analysis of Variance on Ranks). No último período de estudo (quatro horas após a liberação da compressão muscular), essa diminuição adquiriu significância estatística em comparação com o grupo uma hora (teste de Dunn $p < 0,05$) (fig. 3).

Discussão

Existem diversos modelos experimentais para o estudo da lesão por compressão muscular e síndrome de esmagamento.^{7,8,12-15} Com nosso modelo, os resultados demonstraram alterações significantes dos níveis de IL 10 após quatro horas da liberação da compressão.

Embora os resultados mais reprodutíveis tenham sido encontrados em modelos experimentais, ensaios clínicos relacionam os níveis de citocinas plasmáticas e a gravidade de pacientes com múltiplas lesões traumáticas.¹⁶ Recentemente, os modelos de SE têm focado não apenas nos achados clássicos da SE, mas também em alterações sistêmicas relacionadas com a resposta inflamatória.^{7,8} Entretanto, dentro do que revisamos na literatura, não há estudos que relacionem a SE com a produção de interleucinas 1, 6, 10 e do TNF- α no plasma, como neste estudo.

Interleucinas são polipeptídeos produzidos por células inflamatórias e exercem sua ação local próximo de onde foram produzidos.¹⁷ Fibras musculares danificadas podem produzir citocinas como TNF- α , IL 1 β e IL 6 (2). Quando há uma grande produção das interleucinas, ocorre um extravasamento dessas substâncias para o plasma. Nessas condições biológicas, algumas dessas citocinas serviriam de gatilho para uma reação inflamatória sistêmica.¹⁷

Resultados interessantes indicam que a IL10 tem um papel regulatório importante nas repostas imunológicas e inflamatórias, pela sua capacidade de inibir a produção de citocinas

pró-inflamatórias por monócitos.¹⁸ A IL 10 diminui os níveis de inflamação induzida pelo TNF alfa em células endoteliais, como a produção de espécies reativas de oxigênio e adesão de leucócitos ao endotélio.¹⁹ Não é claro se a IL 10 está ligada a lesão muscular, mas há alguma evidência de que níveis moderados a elevados de IL 10 inibam a produção de IL 1 e IL 6 em tais condições.²⁰ Nossos achados (aumento de IL 10 e não identificação de citocinas inflamatórias) podem ser explicados por essas interações entre a IL 10 e as citocinas inflamatórias.

Nesse modelo, citocinas pró-inflamatórias não foram encontradas no plasma após a lesão causada pela compressão isolada dos membros inferiores de ratos. Na revisão da literatura, encontramos dados que ajudam a discutir a não detecção dessas substâncias. Há alguma evidência de que a IL 6 seria produzida apenas em músculos contraídos no momento do trauma.² Por causa do efeito da anestesia, no modelo aqui proposto os músculos estariam relaxados no momento da aplicação da compressão, fato que pode corroborar os resultados negativos encontrados na produção de citocinas inflamatórias. Além disso, é possível que variações sutis da concentração de IL 1, IL 6 e TNF- α não tenham sido detectadas nesse modelo pelos limites da metodologia empregada ou mesmo pelos tempos que determinamos para a detecção (uma, duas e quatro horas), pois sabemos que as interleucinas podem ter uma meia-vida de apenas alguns minutos. É importante reforçar que a IL 10 esteve presente uma hora após a liberação da compressão e que houve uma diminuição progressiva das concentrações plasmáticas ao longo do experimento. Como dito anteriormente, estudos sugerem que a reação inflamatória final depende da resultante entre os mediadores pró e anti-inflamatórios.²⁰ Indiretamente, o decréscimo da concentração plasmática de IL 10 poderia estar relacionado com a presença circulante de IL 1, IL 6 e TNF- α . Como conclusão, embora a IL 10 seja uma citocina anti-inflamatória, os níveis encontrados podem ser um sinal indireto da presença de interleucinas inflamatórias nesse modelo de compressão muscular em ratos.

Conclusões

Nosso modelo experimental de lesão muscular por compressão (lesão muscular por esmagamento) demonstrou a presença e a variação dos níveis de IL 10 no plasma, com um pico uma hora após a liberação da compressão e diminuição dos valores encontrados quatro horas após.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Sgarbi MW, Silva Junior BA, Hungria JS. Importância da reação inflamatória sistêmica (SIRS) no prognóstico de pacientes politraumatizados. *Rev Bras Ortop.* 2006;41(1/2):1-6.
2. Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports Med.* 2008;38(11):947-69.

3. Giannoudis PV, Hildebrand F, Pape HC. Inflammatory serum markers in patients with multiple trauma Can they predict outcome? *J Bone Joint Surg Br.* 2004;86(3):313-23.
4. Foëx BA. Systemic responses to trauma. *Br Med Bull.* 1999;55(4):726-43.
5. Gonzalez D. Crush syndrome. *Crit Care Med.* 2005; 33(1 Suppl):S34-41.
6. Bywaters EGL, Popjak G. Peripheral circulatory collapse and other effects of muscle necrosis in the rabbit. *Surg Gynecol Obstet.* 1942;612-27.
7. Murata I, Ooi K, Sasaki H, Kimura S, Ohtake K, Ueda H, et al. Characterization of systemic and histologic injury after crush syndrome and intervals of reperfusion in a small animal model. *J Trauma.* 2011;70(6):1453-63.
8. Sgarbi MW, Silva BA Jr, Peres CM, Alba TC, Curi R, Soriano FG, et al. Leukocyte infiltration in lung, muscle, and liver after limb compression in rats. *Pathophysiology.* 2013;20(2):111-6.
9. Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system I: Expression and recognition. *Trends Neurosci.* 1995;18(2):83-8.
10. Call DR, Nemzek JA, Ebong SJ, Bolgos GL, Newcomb DE, Remick DG. Ratio of local to systemic chemokine concentrations regulates neutrophil recruitment. *Am J Pathol.* 2001;158(2):715-21.
11. Winkelman C. Inactivity and inflammation: selected cytokines as biologic mediators in muscle dysfunction during critical illness. *AACN Clin Issues.* 2004;15(1):74-82.
12. Akimau P, Yoshiya K, Hosotsubo H, Takakuwa T, Tanaka H, Sugimoto H. New experimental model of crush injury of the hindlimbs in rats. *J Trauma.* 2005;58(1):51-8.
13. Blachar Y, Fong JS, de Chadarevian JP, Drummond KN. Muscle extract infusion in rabbits. A new experimental model of the crush syndrome. *Circ Res.* 1981;49(1):114-24.
14. Bywaters EG, Beall D. Crush injuries with impairment of renal function. *Br Med J.* 1941;1(4185):427-32.
15. Emig U, Schmidt G, Hellige G, Vetterlein F. Contribution of myoglobin-induced increases in vascular resistance to shock decompensation in experimental crush-syndrome in anesthetized rats. *Shock.* 2003;19(1):79-84.
16. DeLong WG Jr, Born CT. Cytokines in patients with polytrauma. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;(422):57-65.
17. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003;348(2):138-50.
18. De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 1991;174(5):1209-20.
19. Huet O, Laemmel E, Fu Y, Dupic L, Aprico A, Andrews KL, et al. Interleukin 10 antioxidant effect decreases leukocytes/endothelial interaction induced by tumor necrosis factor α . *Shock.* 2013;39(1):83-8.
20. Lyons A, Goebel A, Mannick JA, Lederer JA. Protective effects of early interleukin 10 antagonism on injury-induced immune dysfunction. *Arch Surg.* 1999;134(12):1317-23.