

Ana Luiza Perez Olivé Dias, Cristiane Bauermann Leitão

Serviço de Endocrinologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS. Porto Alegre, RS, Brasil.

## Introdução

O intenso estresse inflamatório produzido pela morte encefálica (ME) do doador causa danos em vários órgãos destinados a transplante, inclusive o fígado, e está entre os fatores que impactam negativamente as taxas de sucesso dos transplantes hepáticos. Estudos anteriores demonstram que a ME do doador aumenta a taxa de apoptose no tecido hepático, além de induzir aumento de transaminases hepáticas na circulação.

Exendin-4, um análogo do *glucagon-like peptide-1* (GLP-1), é uma droga reconhecida por suas atividades antiinflamatórias e anti-apoptóticas sobre células-beta pancreáticas. Recentemente, benefícios dessa droga sobre células hepáticas foram demonstrados *in vitro*. Além disso, Exendin-4 apresentou papel protetor em modelos de doenças hepáticas em ratos.

## Objetivos

➤ Avaliar o efeito da ME sobre o tecido hepático em relação a níveis de marcadores de dano hepático, apoptose e expressão gênica de citocinas pro-inflamatórias.

➤ Avaliar o possível papel protetor da Exendin-4 contra os danos no fígado causados pela ME no doador.

## Material e Métodos

➤ O modelo de ME explosiva em ratos Wistar foi executado através de trepanação da região fronto-lateral esquerda do crânio, seguida de inserção de um cateter de embolectomia com insuflação de 0,60 ml de solução salina durante 60 segundos. O diagnóstico da ME foi confirmado por meio de critérios clínicos e hemodinâmicos. Após os procedimentos de indução da ME, os animais foram mantidos com ventilação mecânica por 6 horas adicionais e amostras do sangue periférico e tecido hepático foram coletadas ao final deste período (Fig. 1).

➤ Animais machos pesando entre 300 e 350 gramas foram randomizados em três grupos experimentais: **Controle**, sem lesão cerebral; **ME**, indução da morte encefálica; **ME+Exendin-4**, indução da morte encefálica seguida de administração intraperitoneal de 5 µg/Kg de Exendin-4.

➤ Foram realizados *Western Blot* e imunohistoquímica para a identificação de Caspase 3 ativada (marcador de apoptose); dosagem de proteínas hepáticas na circulação por métodos bioquímicos de rotina e PCR quantitativo em tempo real (RTqPCR) para avaliação da expressão gênica de citocinas pro-inflamatórias.

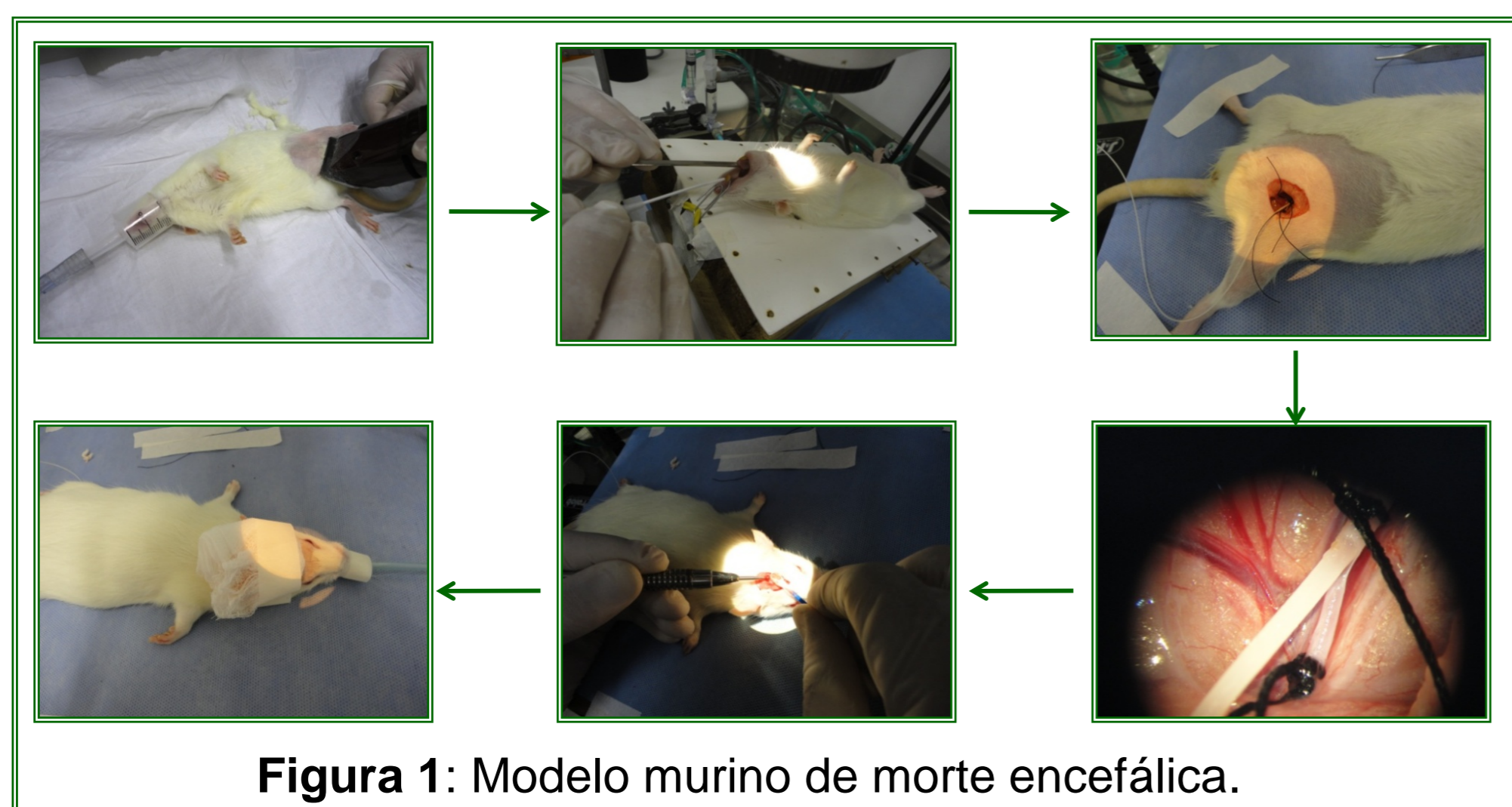


Figura 1: Modelo murino de morte encefálica.

## Resultados

➤ Os níveis plasmáticos das proteínas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), lactato desidrogenase (LDH) e fosfatase alcalina (AP) foram dosados no plasma dos animais (Fig. 2). Foi observado um aumento de AST e LDH nos animais do grupo ME quando comparados com os animais do grupo controle e uma proteção contra esse aumento foi observada em animais do grupo ME+Ex-4 para níveis de AST ( $p < 0.001$ ) e LDH ( $p < 0.01$ ). Os níveis de ALT e AP não diferiram significativamente entre os grupos.

➤ A expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias *TNF*, *IL-1b*, *CCL2* e *IL6* é mostrada na Fig. 3. Observou-se um aumento significativo da expressão de *TNF* no grupo ME ( $p < 0.01$ ); entretanto, o tratamento com Exendin-4 não apresentou efeito sobre esse aumento ( $p < 0.05$ ). As expressões gênicas de *IL-1b*, *CCL2* e *IL6* não diferiram entre os grupos.

➤ A apoptose no tecido hepático foi avaliada por *Western Blot* e imunohistoquímica (Fig. 4), através da identificação da forma ativa da Caspase-3. Bandas correspondentes à forma ativa da Caspase-3 foram apenas observadas em amostras do grupo ME. Efeitos similares foram observados quando a apoptose foi estimada pela técnica de imunohistoquímica.

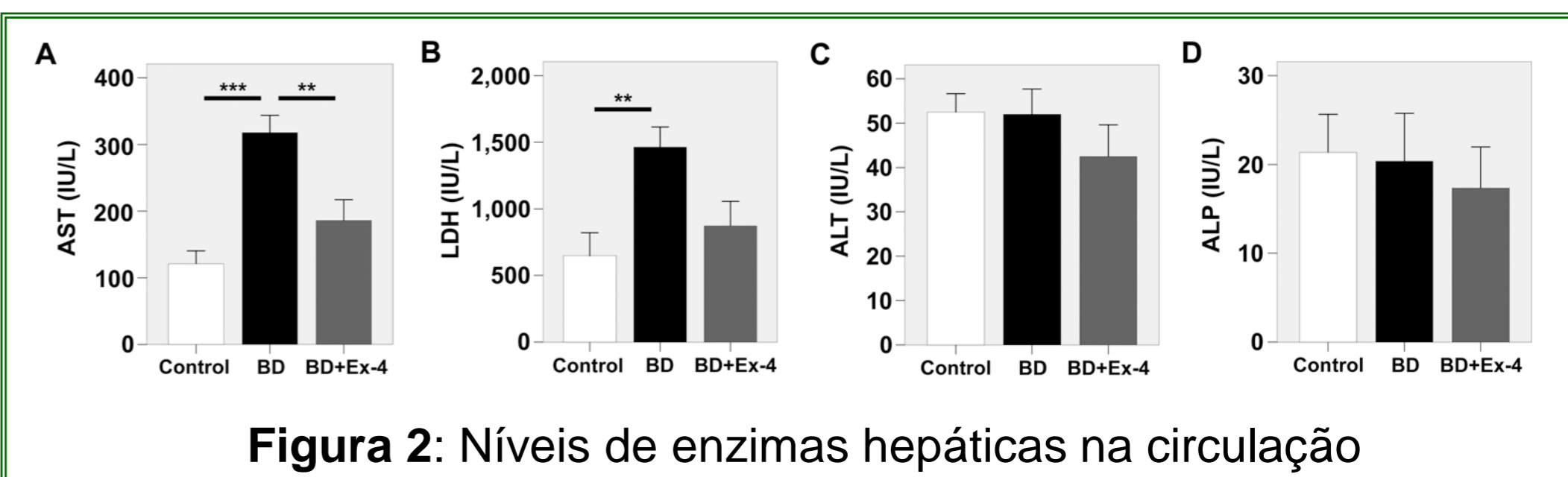


Figura 2: Níveis de enzimas hepáticas na circulação

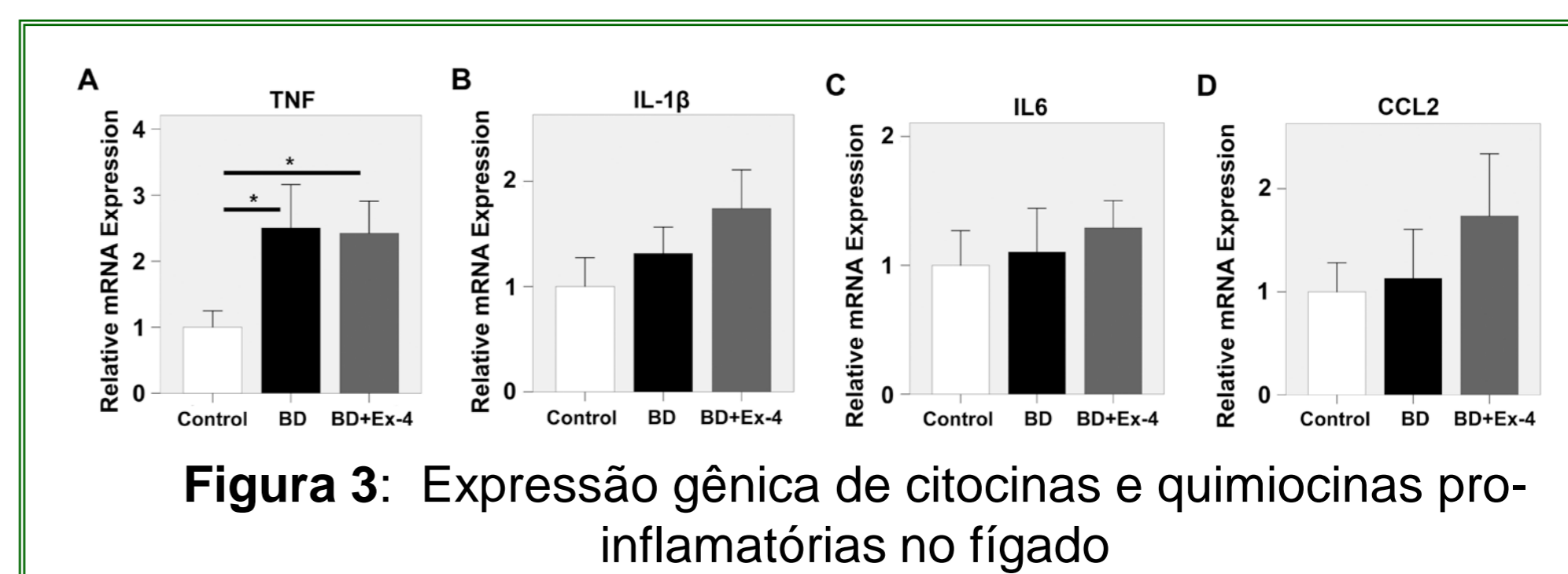


Figura 3: Expressão gênica de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias no fígado

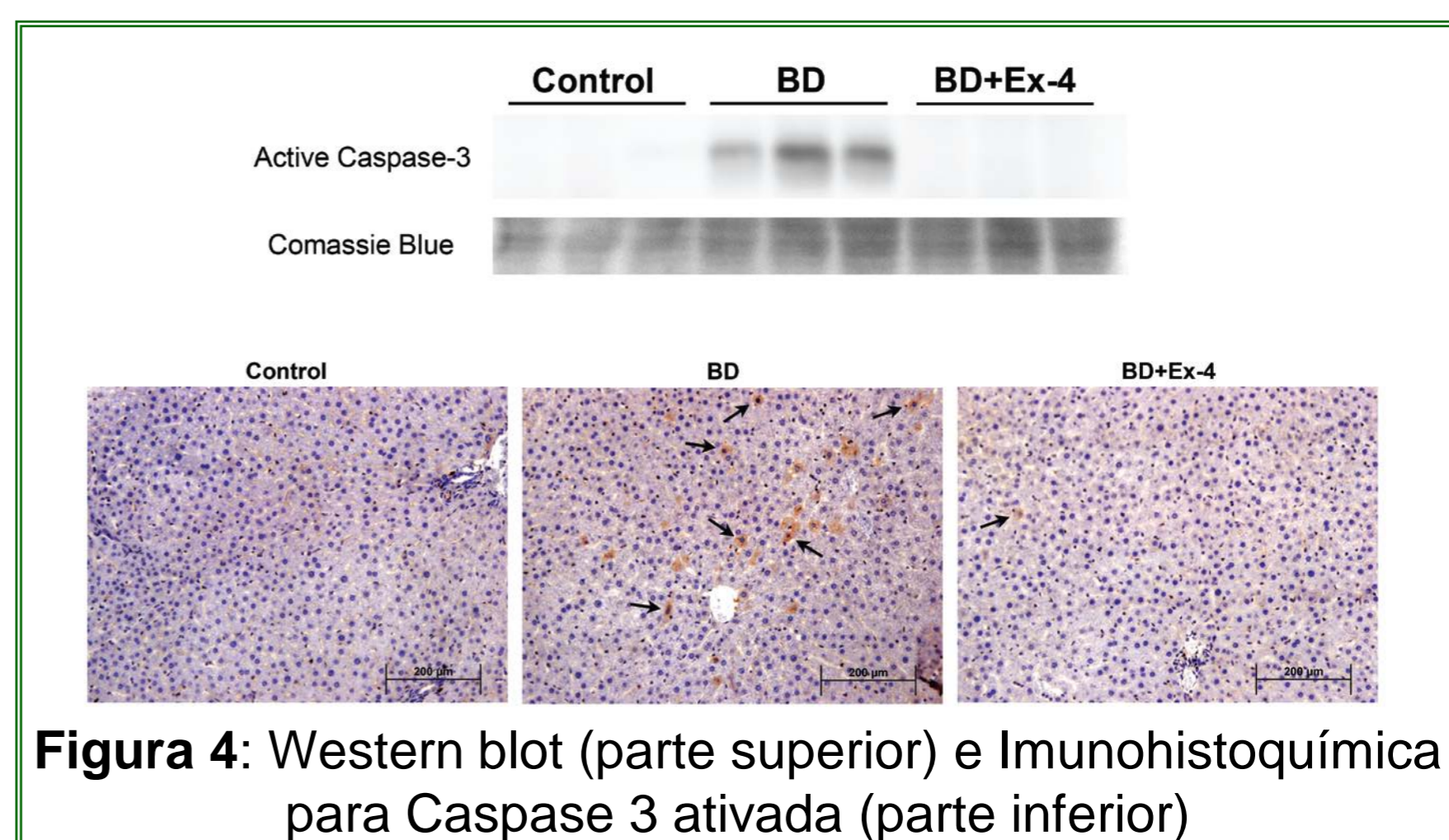


Figura 4: Western blot (parte superior) e Imunohistoquímica para Caspase 3 ativada (parte inferior)

## Conclusões

Nossos dados confirmam que a ME induz apoptose no fígado, além de aumentar os níveis de enzimas hepáticas na circulação. O tratamento com Exendin-4 protegeu contra esses efeitos deletérios causados pela ME. Entretanto, o tratamento com exendina-4 não parece alterar a inflamação induzida pela ME (aumento de TNF).