

# Inibição da guanilato ciclase pelo azul de metileno no choque circulatório causado por pancreatite aguda necrosante: uma palavra de cuidado embasada em modelo suíno

## *Guanylate cyclase inhibition by methylene blue in circulatory shock caused by acute necrotizing pancreatitis: a word of caution based on a porcine model*

CAROLINE FLOREOTO BALDO<sup>1</sup>; VERENA KISE CAPELLINI<sup>2</sup>; ANDREA CARLA CELOTTO<sup>2</sup>; FABIANE SÔNEGO<sup>3</sup>; LUIS FERNANDO TIRAPELLI<sup>2</sup>; MARCELO BATALHÃO<sup>4</sup>; EVELIN CAPELLARI CÁRNIO<sup>4</sup>; JOSÉ SEBASTIÃO DOS SANTOS<sup>2</sup>; PAULO ROBERTO BARBOSA EVORA<sup>2</sup>

### R E S U M O

**Objetivo:** estudar o uso terapêutico do bloqueio da guanilato ciclase pelo azul de metileno em um modelo experimental de pancreatite aguda grave em suínos. **Métodos:** a pancreatite aguda necrotizante foi induzida em porcos anestesiados por infusão ductal pancreática retrógrada de 1ml/kg de taurocolato de sódio a 5% e 8U/kg de enteroquinase. Três grupos foram estudados (n=5): controle (C), pancreatite (PA), "bolus" de azul seguido por pancreatite (AM+PA). Os dados incluíram enzimas séricas e do líquido abdominal, variáveis hemodinâmicas, hemogasometria arterial, volume de líquido abdominal, marcadores inflamatórios plasmáticos, nitrito/nitrato e mieloperoxidase e malondialdeído plasmático. Aplicou-se a análise de variância seguida do pós-teste de Bonferroni (p<0,05). **Resultados:** os valores de amilase e lipase foram três e dez vezes mais elevados no grupo PA. A atividade da mieloperoxidase foi 50% superior no grupo PA. Os dados hemodinâmicos indicaram choque hipovolêmico precoce seguido de choque cardiogênico. Observou-se grave translocação de líquidos para a cavidade peritoneal. A nitrito/nitrato plasmática permaneceu inalterada. O grupo AM+PA teve aumento de cinco vezes do mieloperoxidase em comparação com o grupo C. **Conclusões:** a utilização de azul de metileno em suínos com pancreatite não demonstrou efeitos significativos sobre variáveis hemodinâmicas e inflamatórias. Seu uso terapêutico na pancreatite necro-hemorrágica pode ser inadequado e extremo cuidado deve ser tomado dado o aumento da peroxidação lipídica evidenciado pelo aumento dos valores do malondialdeído.

**Descritores:** Pancreatite. Óxido nítrico. Radicais livres. Azul de metileno. Guanilato ciclase.

### INTRODUÇÃO

Desde a descoberta e isolamento do óxido nítrico como fator de relaxamento derivado do endotélio no início da década de 90, vários estudos têm sido realizados para melhor compreender as implicações deste autacoide no estado de choque e síndromes inflamatórias. Maus resultados associados com a liberação superregulada de óxido nítrico pela ação da óxido nítrico sintase induzível, indicam que a via óxido nítrico/ 3',5'-monofosfato de guanossina cíclico (NO/GMPc) pode ser um alvo potencial para numerosas intervenções terapêuticas. Essa via está associada à disfunção endotelial, desarranjo microcirculatório, grave perda de fluido, e hipotensão crítica<sup>1</sup>. A inibição da via

3',5'-monofosfato de guanossina cíclico/guanilato ciclase solúvel (GMPc-GCs) pelo azul de metileno (AM), uma matriz tiazida, tem se mostrado muito eficaz em choque distributivo que não responde à administração exógena de catecolaminas<sup>2-5</sup>. Assim, o azul poderia ser uma opção terapêutica de salvamento para o tratamento do choque circulatório causado por pancreatite aguda (PA).

Estudos da PA têm sido amplamente realizados em animais de pequeno porte, o que poderia indicar que sua fisiopatologia não está relacionada à liberação de óxido nítrico. Os grandes animais podem representar um modelo apropriado de pancreatite porque a sua fisiologia se assemelha mais à fisiologia dos seres humanos. Em estudo anterior<sup>6</sup>, os autores utilizaram o AM depois de estabelecida

Trabalho realizado no Laboratório de Função Cardiovascular e Endotelial do Departamento de Cirurgia e Anatomia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

1. Pós-Graduandas do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil; 2. Pós-Graduanda do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil; 3. Professores Associados do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil; 4. Técnico de Laboratório do Departamento de Enfermagem Geral e Especializada da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil; 5. Professora Associada do Departamento de Enfermagem Geral e Especializada da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil; 6. Professor Titular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

a PA em porcos que indicou fisiopatologia semelhante aos seres humanos, sem aumento exponencial do óxido nítrico. O laboratório dos autores tornou-se referência para a sua utilização no tratamento de choque clínico vasoplégico, e perguntas são frequentemente feitas sobre o seu uso como terapia de salvamento na PA grave.

Esta foi a justificativa para o presente estudo, que investigou o uso terapêutico do AM na PA em suínos. O projeto do estudo incluiu parâmetros hemodinâmicos do choque circulatório e marcadores inflamatórios.

## MÉTODOS

Porcas Dalland pesando 16-22kg foram mantidas em jejum na noite antes do estudo, mas a água foi *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais e protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto, que seguiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Protocolo número: 119/2007, aprovado em 29/10/2007).

Os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de 0,5mg/kg de midazolam, combinado com 10mg/kg de tiletamina/lorazepam. A anestesia foi mantida pela administração intravenosa de 20mg/kg/h de fentanil e 15mg/kg/h de propofol. Todas as drogas foram injetadas por bomba de infusão tipo seringa.

A traqueostomia foi realizada em todos os animais imediatamente após a indução da anestesia. Um cateter de Swan-Ganz CCOmbo CCO/SvO<sub>2</sub> 744HF75 e um cateter de polietileno foram introduzidos na veia jugular direita e artéria carótida esquerda, previamente dissecadas. Uma vez posicionados os cateteres, procedeu-se a laparotomia mediana que se iniciou a 3cm do xifoide e estendida 5cm caudalmente expondo-se o pâncreas. A manipulação cuidadosa do órgão permitiu a identificação, dissecação e cateterização do ducto pancreático principal localizado, distalmente, na terceira porção da borda mesentérica do arco duodenal. O ducto foi cateterizado com um cateter de polipropileno de calibre 18 e fixado no local com sutura de algodão 3-0. O cateter foi conectado à uma linha de extensão, e uma seringa preparada com solução de taurocolato e enteroquinase ajustada para o peso do animal.

Depois da instrumentação aguardaram-se 20min para permitir a estabilização da anestesia. O suporte volêmico foi estabelecido com infusão intravenosa de 5ml/kg/h de cloreto de sódio a 0,9%. Os parâmetros hemodinâmicos foram registrados a cada 30min durante um total de seis horas de observação. Amostras venosas e de sangue arterial foram colhidas imediatamente antes e a cada duas horas após a indução da pancreatite. As amostras de líquidos, a avaliação do volume abdominal e a coleta do tecido pancreático foram realizadas no final do período experimental.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente para um dos três grupos seguintes: 1) controle (grupo C, n=5; os animais foram submetidos à laparotomia, o pâncreas foi levemente manipulado, e o ducto pancreático não foi cateterizado); 2) pancreatite aguda (grupo PA; n=5; o ducto pancreático foi cateterizado seguido por indução da pancreatite); e 3) pré-tratamento com azul de metileno antes da indução da pancreatite. (grupo AM+PA, n=5; imediatamente antes da indução, os animais receberam um "bolus" endovenoso de AM 1%).

### Indução da pancreatite aguda

O modelo utilizado para induzir a PA consistiu de uma injeção intraductal retrógrada de 1ml/kg de taurocolato de sódio a 5%, combinado com 8U/kg de enteroquinase ao longo de 2min usando uma bomba de seringa.

O azul de metileno (1%) foi preparado por mistura de 10mg de pó de azul com 1ml de água estéril. A solução foi preparada imediatamente antes da utilização, e todas as linhas de infusão foram cuidadosamente recobertas com folha de alumínio para proteger da inativação induzida pela luz. A injeção intravenosa do azul (3mg/kg) foi administrada durante 5min após o período de estabilização, utilizando bomba de seringa.

Concentrações de amilase e lipase foram medidas utilizando o método cinético com tempo fixo e método de atividade enzimática, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante.

Níveis de óxido nítrico foram obtidos através da medição das concentrações plasmáticas de seus produtos finais estáveis nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), conjuntamente conhecidos como nitrito/nitrato. As medidas foram realizadas por quimioluminescência usando o *NO Analyzer*. As amostras de sangue: heparina (1:20) foram centrifugadas a 5000 rotações por minuto (rpm) durante 10min, e o plasma foi imediatamente separado, imerso em azoto líquido e armazenado a -70°C. Para a análise, a desproteinização do plasma foi realizada com proporção de 1:2 de 4% de etanol absoluto, mantendo a solução em repouso durante 30min em congelador -20°C durante 30min. As amostras foram então centrifugadas a 4000rpm durante 10min e armazenadas para análise posterior. A concentração de nitrito/nitrato foi corrigida por um fator de diluição de '3' pela desproteinização. Além disso, esta concentração foi corrigida por fator obtido pelo quociente de nitrito/nitrato medido e as concentrações esperadas de nitrato de sódio (5, 10, 25, 50, e 100mM), obtendo-se uma curva padrão. Os valores foram expressos em micrômetros.

### Os parâmetros hemodinâmicos

O cateter de Swan-Ganz CCOmbo CCO/SvO<sub>2</sub> 744HF75 foi introduzido pela veia jugular direita e mantido na luz do tronco da artéria pulmonar. A carótida esquerda foi cateterizada simultaneamente. A pressão arterial mé-

dia, pressão arterial média pulmonar, pressão capilar pulmonar e frequência cardíaca foram registradas utilizando o Sistema MP 100 A. O índice cardíaco, saturação venosa de oxigênio da hemoglobina e temperatura central foram registrados usando o *Monitor Vigilance*. Como complemento para o estudo hemodinâmico, amostras de sangue arterial foram utilizadas para hemogasometria e dosagem de eletrólitos usando hemogasômetro previamente calibrado. Além disso, o fluido da cavidade abdominal foi cuidadosamente aspirado e transferido para uma bureta e medido para determinar o volume de ascite.

### **Os marcadores inflamatórios interleucina-1 $\beta$ e interleucina-6, exsudatos de leucócitos e mieloperoxidase**

A inflamação foi investigada através da medição da interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e IL-6. As concentrações no soro, com o auxílio de um kit porcino específico comercial, de acordo com as instruções do fabricante. O tecido peritoneal, corado pelo método de Giemsa modificado Wolbach, foi utilizado para a contagem de neutrófilos. Todas as análises foram realizadas com microscópio Zeiss Axioskop 2 plus. Os campos analisados foram fotografados usando câmera Axio Cam Hrc acoplada ao microscópio e salvos usando o Vision Axio 4,6 software.

A atividade de neutrófilos foi determinada medindo a atividade da mieloperoxidase em tecido pancreático utilizando o método de tetrametilbenzidina. Um mililitro de tampão 1 (NaCl 0,1 M, 0,015 M NaEDTA diluído em NaPO<sub>4</sub> 0,02 M, pH 4,7) foi adicionado à 0,5mg de tecido e centrifugado a 13.000rpm. Este processo foi repetido três vezes. A solução foi então centrifugada a 3000rpm durante 15min, e o sobrenadante foi descartado. O lizado foi ressuspensão com 2,5ml de tampão 2 (1 g H-TAB em 200ml de 0,05 M NaPO<sub>4</sub>, pH 5,4) e armazenado em um congelador -70°C. Antes da análise, a amostra foi descongelada e centrifugada a 10.000rpm a 4°C durante 15min. Diluições em série das amostras mais 25 l tetrametilbenzidina e 100 de peróxido de hidrogênio reagiram entre si durante 5min, enquanto protegida da luz. O ácido sulfúrico foi adicionado para parar a reação, e as amostras foram submetidas a um ensaio por ELISA.

### **Malondialdeído**

Atividade indireta de radical livre foi estimada pela medição de malondialdeído em tecido pancreático utilizando a técnica do tiobarbiturato. Resumidamente, 20mg da amostra de tecido foi sonicada em 200ul de 1,15% de KCl, refrigerada e centrifugada a 10.000rpm a 4°C durante 10min. Ácido tricloroacético (10%, 200ul) foi adicionado a 100ul de sobrenadante, permitindo que a nova solução fosse incubada em gelo durante 15min. As amostras foram então centrifugadas a 2200rpm durante 15min, e 0,67% de ácido tiobarbitúrico foi adicionado ao sobrenadante, permitindo que nova solução ficasse em

ebulição a 95°C durante 50min. Após arrefecimento, as amostras foram duplicadas e submetidas ao leitor de ELISA com comprimento de onda ajustado a 532nm.

### **Análise estatística**

O presente estudo seguiu o modelo de um estudo controlado randomizado experimental. A média dos valores, registrados a cada 30min e 120min, foi submetida à análise de duas vias para medidas repetidas de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni com probabilidade de 5% de erro do tipo I ( $p < 0,05$ ). As médias dos valores obtidos ao fim do período de seis horas foram submetidas à ANOVA uma via, seguido do pós-teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

### **Amilase e lipase sérica e ascítica**

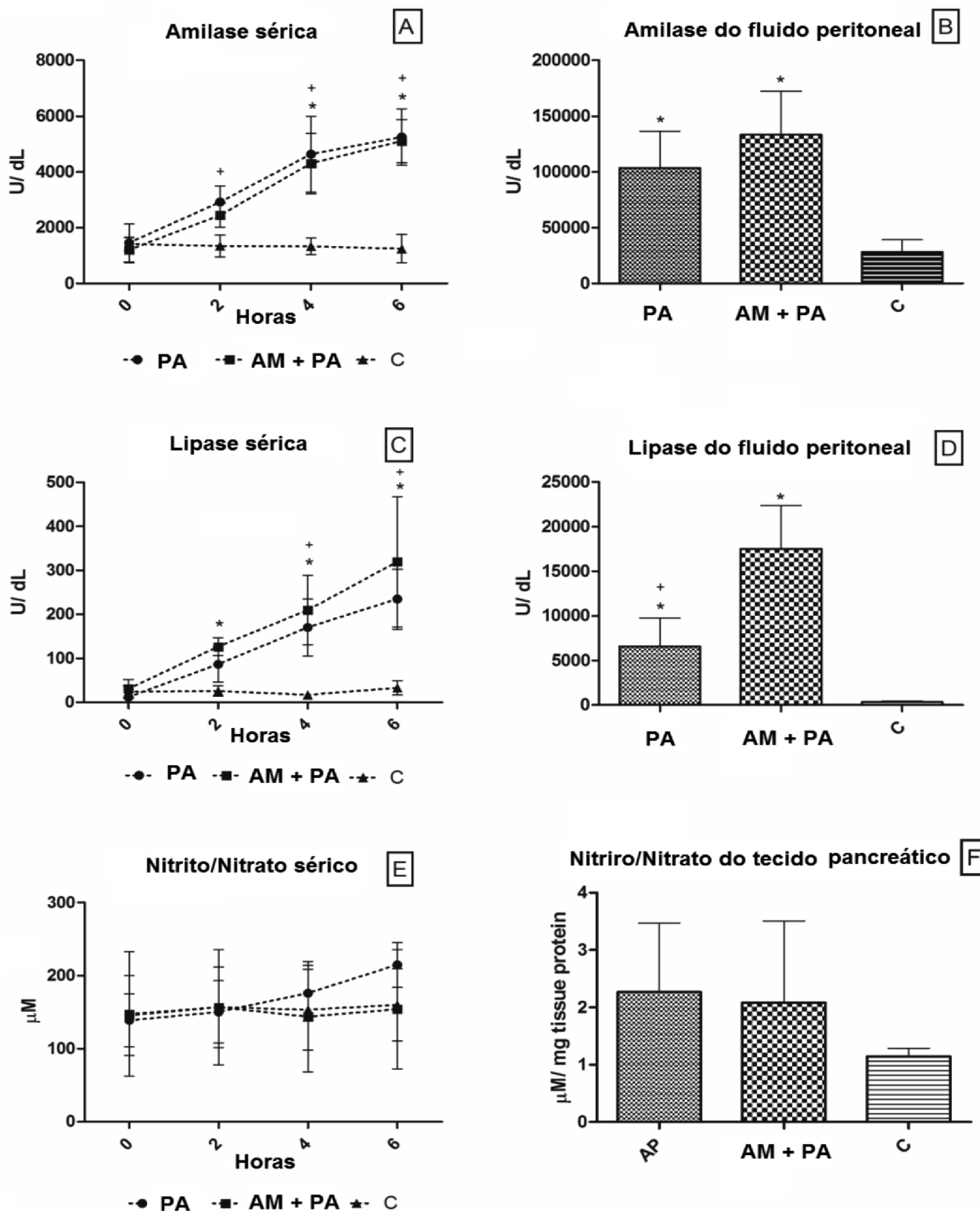
A PA induzida causou aumentos significativos da amilase e lipase séricas. A administração do AM retardou o aumento de amilase e lipase, mas não diminuiu seus valores (Figura 1 A-D). A avaliação da lipase no fluido abdominal revelou maiores concentrações destas enzimas quando o azul foi administrado (Figura 1D).

### **Nitrito e nitrato de plasma (NOx)**

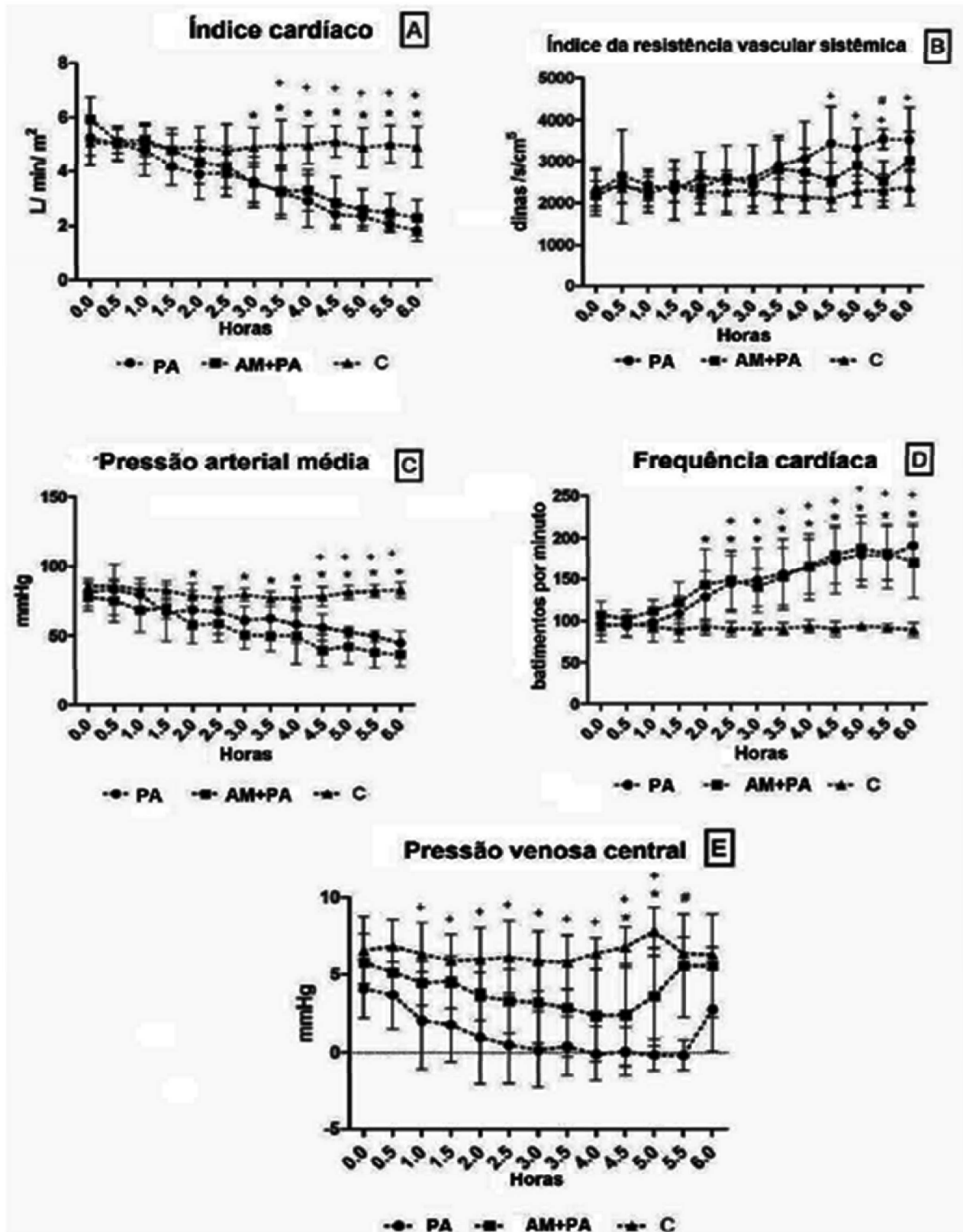
Embora pequenos aumentos dos níveis de óxido nítrico fossem encontrados no grupo PA em comparação com os grupos C e AM+PA, as médias entre os grupos permaneceu estatisticamente inalterada em tecido pancreático e plasma (Figura 1 E e F).

### **Os parâmetros hemodinâmicos**

As alterações hemodinâmicas iniciaram-se aproximadamente três horas após a indução da pancreatite. No grupo PA, as variáveis pulmonares permaneceram inalteradas, com a exceção do índice de resistência vascular pulmonar, que aumentou progressivamente após a quarta hora e atingiu o valor mais elevado na sexta ( $1538 \pm 82$  dinas/s/cm<sup>5</sup>) em comparação com o grupo C ( $454 \pm 68$  dinas/s/cm<sup>5</sup>). A pressão venosa central média diminuiu progressivamente até ao quinto minuto e chegou a valores negativos ( $-0,16 \pm 1$  mmHg), com diminuição do índice cardíaco e da pressão arterial média e aumentos da frequência cardíaca e do índice de resistência vascular sistêmica (Figura 2). Na sexta hora, a pressão venosa central aumentou ( $2,74 \pm 2,65$  mmHg). A administração de azul no grupo AM+PA seguiu o mesmo padrão do grupo PA. Os valores de índice de resistência vascular sistêmica, pressão média da artéria pulmonar (Figura 2 B e C), e pressão capilar pulmonar foram intermediários entre as médias obtidas para os grupos C e PA e não foram estatisticamente diferentes. O AM retardou a redução da pressão venosa central, revelando significativa redução nas 4,5 e 5 horas em comparação com o grupo C (Figura 2E).



**Figura 1** - Gráfico dos valores médios e desvio-padrão para: amilase sérica (A), amilase do fluido peritoneal (B), lipase sérica (C), lipase do fluido peritoneal (D), nitrito e nitrato sérico (E) e nitrito e nitrato do fluido peritoneal (F) dos porcos controle e porcos submetidos à pancreatite hemorrágica necrotizante aguda por infusão retrógrada intraductal de taurocolato de sódio e enteroquinase, pré-tratados ou não com azul de metileno. + C difere do AP. \* C difere do AM + PA. Significância para o tipo I de erro foi considerada quando  $p < 0,05$ .



**Figura 2** - Valores médios e desvio-padrão para: o índice cardíaco (A), o índice da resistência vascular sistêmica (B), a pressão arterial média (C), a frequência cardíaca (D), e a pressão venosa central (E) dos porcos controle e porcos submetidos à pancreatite hemorrágica necrotizante aguda por infusão retrógrada intraductal de taurocolato de sódio e enteroquinase, pré-tratados ou não com azul de metileno. + C difere do PA. \* C difere do AM+PA; # PA difere AM+PA. Significância para o tipo I de erro foi considerada quando  $p < 0,05$ .

## Marcadores inflamatórios

### Interleucinas-1 $\beta$ IL-6

Surpreendentemente, os níveis de IL-1 $\beta$  foram indosáveis, e os níveis de IL-6 significativamente aumentados após duas horas da indução da pancreatite, em comparação com o grupo C (199,14 $\pm$ 82pM/dl). O azul diminuiu os valores de IL-6 a níveis semelhantes aos controles. Hipertermia coincidiu com o aumento de IL-6 em todos os grupos (Figura 3).

### Mieloperoxidase

Esta medida da atividade de neutrófilos aumentou após a indução da pancreatite em comparação com os controles (grupo C, 76,532 $\pm$ 11,360 neutrófilos/100mg de tecido; grupo PA, 425,412 $\pm$ 123,021mg de tecido neutrófilos/100). Administração de azul de metileno não resultou em diferenças significativas em comparação com o grupo PA (MB+PA grupo, 663,926 $\pm$ 66,319) (Figura 4A).

### Peroxidação lipídica

#### Malondialdeído

Níveis deste indicador da peroxidação lipídica aumentaram nos grupos PA e AM+PA comparado com o grupo C. Administração de azul de metileno antes da indução da pancreatite, pioraram os níveis de malondialdeído em comparação com o grupo de PA (AM+AP grupo, 41 $\pm$ 3uM de proteína/mg; grupo PA, 25 $\pm$ 4uM de proteína/mg) (Figura 4B).

### Contagem de neutrófilos no tecido peritoneal

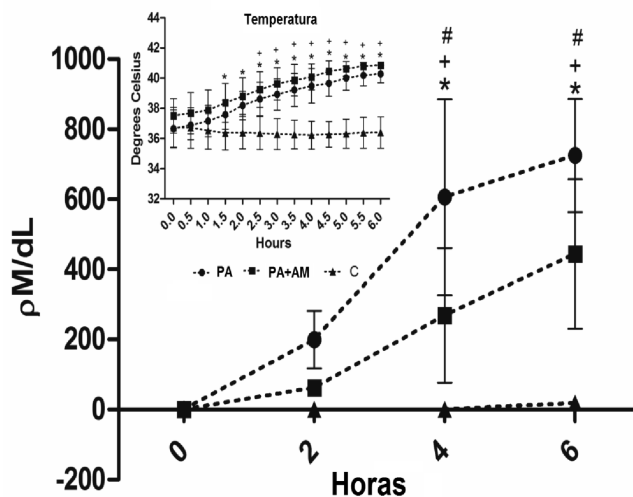
Os números médios de neutrófilos foram maiores nos grupos PA e AM+PA comparados com o grupo C. Não houve diferença significativa entre os grupos PA e AM+PA (Figura 5).

## DISCUSSÃO

### Modelo experimental

Considerando o modelo experimental, as investigações existentes na literatura relatam que a perfusão retrógrada do ducto pancreático com taurocolato/enteroquinase causa a ativação prematura do tripsinogênio, amilaseia, edema, a migração de leucócitos inflamatórios, necrose acinar, e a geração local de mediadores inflamatórios<sup>7</sup>. Todas estas características foram observadas no presente estudo, causando pancreatite necro-hemorrágica grave associada à concentrações elevadas de amilase e lipase no soro e ascite. Altas concentrações são muitas vezes utilizadas para caracterizar e quantificar a gravidade da doença<sup>8</sup>. Pancreatite hemorrágica necrotizante foi também confirmada por estudos macroscópicos e microscópicos (dados não mostrados). O grupo tratado com azul apresentou atraso no aumento da amilase sérica, mas nenhum efeito sobre a lipase. No fluido abdominal, houve aumento

## Interleucina 6 sérica



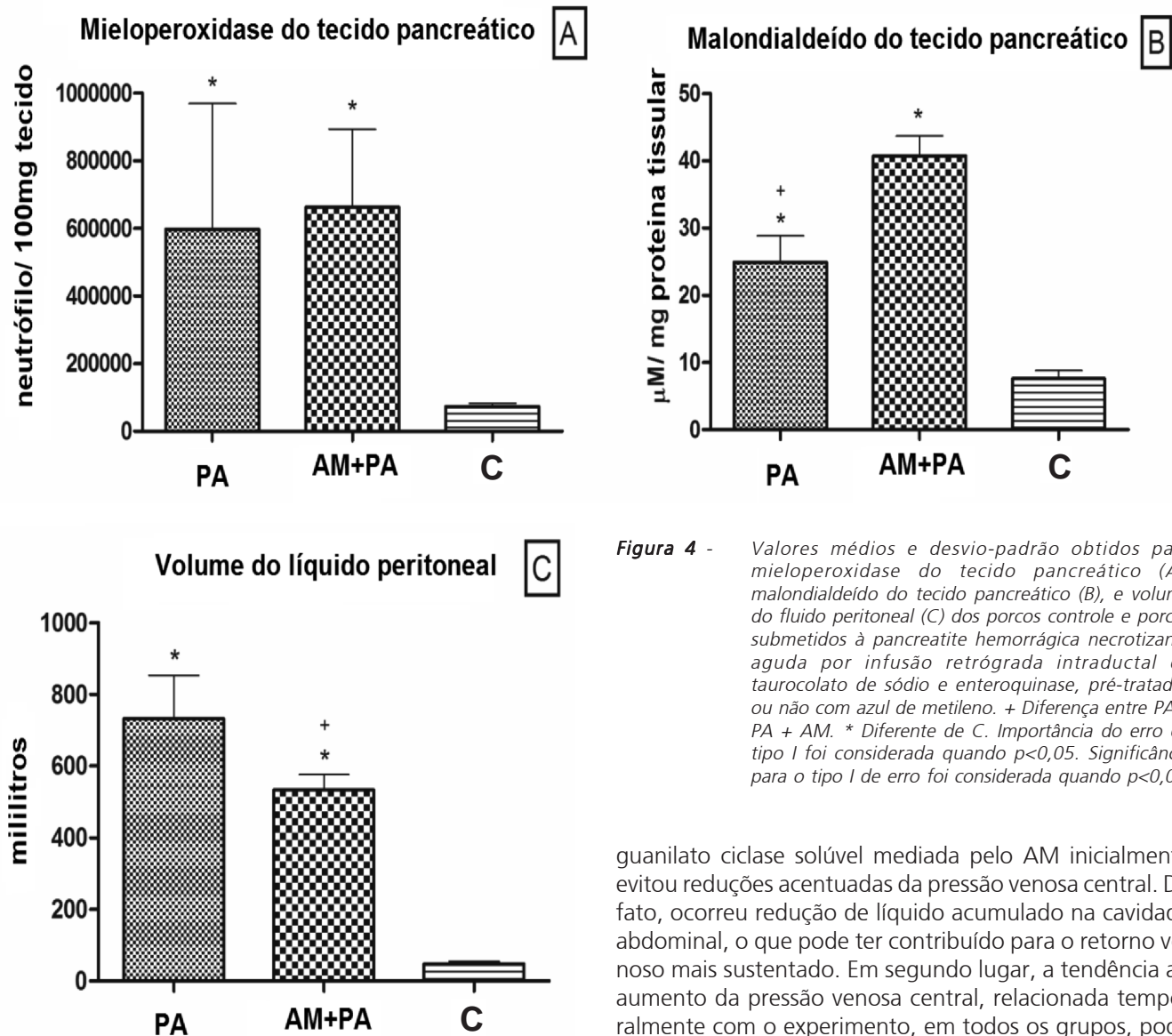
**Figura 3** - Valores médios e desvio-padrão dos valores de Interleucina-6 e temperatura dos porcos controle e porcos submetidos à pancreatite hemorrágica necrotizante aguda por infusão retrógrada intraductal de taurocolato de sódio e enteroquinase, pré-tratados ou não com azul de metileno. + C difere do PA; \* C difere do AM+PA; # PA difere AM+PA. Significância para o tipo I de erro foi considerada quando  $p < 0,05$ .

da lipase no grupo AM+PA. Os níveis reduzidos destas enzimas no sangue em comparação com o fluido abdominal podem ser atribuíveis à liberação local e síndrome de compartimentalização<sup>9</sup>.

O presente estudo marcadamente revelou a não participação capital do óxido nítrico, confirmando o modelo como "não NO". Vários estudos têm como alvo a liberação e ação dele durante a progressão da doença, com muitos relatórios divergentes e convergentes<sup>10,11</sup>. Um dos principais fatores associados a estas disparidades podem ser as espécies estudadas. Em estado de choque induzido por lipopolissacárides endotoxêmicos, ratos e coelhos expressaram diferentes padrões de atividade da óxido nítrico sintase e de liberação do óxido nítrico<sup>12</sup>. A espécie humana apresenta liberação menos acentuada dele do que animais de laboratório<sup>1</sup>, justificando, assim, o modelo suíno para o presente estudo. Pode-se sugerir que o tempo necessário para a indução, expressão e atividade da óxido nítrico sintase induzível e síntese exponencial de óxido nítrico não foi suficiente, dada a natureza fulminante deste modelo. Aumentos prematuros de óxido nítrico têm sido relatados para óxido nítrico sintase endotelial durante PA<sup>10</sup>.

### Estudo hemodinâmico

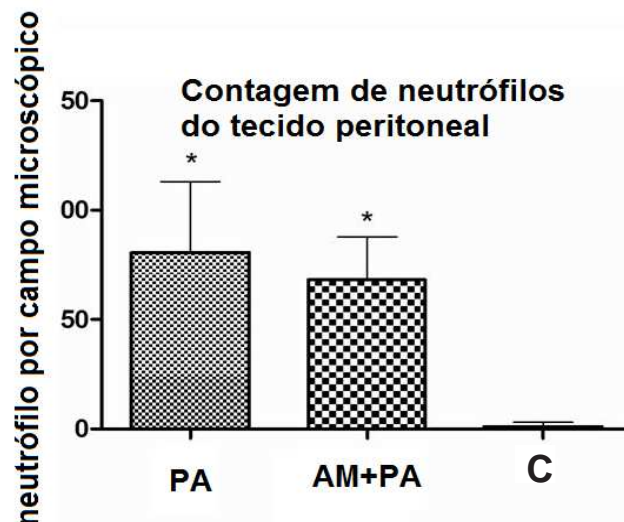
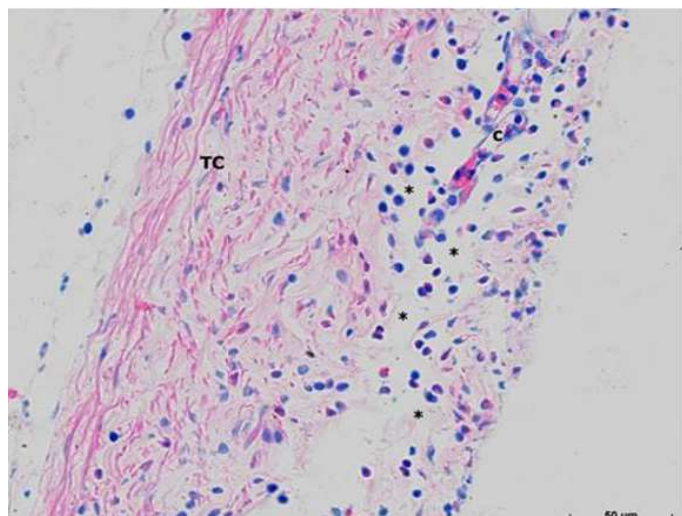
O modelo apresentou uma fase inicial hiperdinâmica de choque hipovolêmico seguido do início do choque cardiogênico, sinais clínicos de síndrome de resposta inflamatória sistêmica e morte. Na sexta hora de observação, os animais estavam pré-agônicos. O primeiro



**Figura 4 -** Valores médios e desvio-padrão obtidos para mieloperoxidase do tecido pancreático (A), malondialdeído do tecido pancreático (B), e volume do fluido peritoneal (C) dos porcos controle e porcos submetidos à pancreatite hemorrágica necrotizante aguda por infusão retrógrada intraductal de taurocolato de sódio e enteroquinase, pré-tratados ou não com azul de metileno. + Diferença entre PA e PA + AM. \* Diferente de C. Importância do erro do tipo I foi considerada quando  $p < 0,05$ . Significância para o tipo I de erro foi considerada quando  $p < 0,05$ .

efeito da pancreatite foi decréscimo significativo na pressão venosa central e pressão capilar pulmonar causado pela depleção de volume e de retorno venoso reduzido, iniciados na primeira hora, seguindo-se aumento do meio para o final do estudo. As consequências hemodinâmicas da PA foram devastadoras com acentuada depleção do volume vascular. Os resultados iniciais foram semelhantes aos observados durante ao choque hipovolêmico associado com a liberação de fatores vasoativos, mediadores inflamatórios e disfunção circulatória. A infusão retrógrada do taurocolato/enteroquinase causou hipovolemia, principalmente após a indução da pancreatite, refletida pela diminuição do índice cardíaco, pressão arterial média e pressão venosa central e aumento da frequência cardíaca e índice de resistência vascular sistêmica, semelhante a outros relatos<sup>13</sup>. A observação dos registros da pressão venosa central revelou dois padrões. Primeiro, a inibição da

guanilato ciclase solúvel mediada pelo AM inicialmente evitou reduções acentuadas da pressão venosa central. De fato, ocorreu redução de líquido acumulado na cavidade abdominal, o que pode ter contribuído para o retorno venoso mais sustentado. Em segundo lugar, a tendência ao aumento da pressão venosa central, relacionada temporariamente com o experimento, em todos os grupos, pode ser atribuída à função miocárdica reduzida resultante da libertação de um fator depressor durante PA<sup>14</sup>, e resultou na hipercalemia/hipocalcemia grave imputável à extensa necrose. Esta observação, em conjunto com os registros da diminuição do índice cardíaco, pode ser o resultado mais significativo dos parâmetros cardiovasculares e indicar a ocorrência de choque cardiogênico, que resultou da depressão da contractilidade do miocárdio. Estudos anteriores já tinham ligado a depressão miocárdica tardia à resposta aos mediadores pró-inflamatórios liberados durante endotoxemia<sup>14</sup> na sepse<sup>15</sup> e choque hemorrágico<sup>16</sup>. A etiologia da depressão do miocárdio é um complexo de resposta e liberação de citocinas associados à inflamação, mecanismos esses associados com diminuição da resposta  $\alpha$ -adrenérgica<sup>17</sup>, diminuição da síntese de energia<sup>18</sup>, e diminuição da sensibilidade contrátil das proteínas ao cálcio<sup>19</sup>. Observou-se breve período de pressão arterial média e índice cardíaco sustentando a taquicardia reflexa, mas seguido de redução iminente causada por hipovolemia gra-



**Figura 5** - Contagem de neutrófilos em tecido peritoneal de porcos controle e porcos submetidos à pancreatite necrotizante hemorrágica aguda por infusão pancreática intraductal retrógrada taurocolato de sódio e enteroquinase, pré-tratados ou não com azul de metileno. A imagem à esquerda mostra o peritônio de um animal do grupo AP mostrando um grande número de neutrófilos (\*) com núcleos azul e citoplasma rosa no tecido conjuntivo (TC); capilar (C). Giemsa, 400x.

ve e redução da pré-carga e do inotropismo. No grupo PA, observou-se aumento do índice de resistência vascular pulmonar, possivelmente causado por vasoconstrição pulmonar hipóxica associada à redução do débito cardíaco. A ocorrência de vasodilatação foi descartada após o cálculo de aumento do índice de resistência vascular sistêmica, que pode ser explicado por aumento na liberação de catecolaminas, resultante da hipovolemia a falta de aumento de óxido nítrico associado com choque circulatório causado pela pancreatite. A falta de maior liberação dele durante o choque pode interferir com os efeitos benéficos da inibição da guanilato ciclase solúvel mediada pelo azul. Após a fase inicial estável, índice cardíaco e frequência cardíaca diminuíram, juntamente com aumento do índice de resistência vascular sistêmica, pressão na artéria pulmonar, pressão capilar pulmonar e pressão venosa central. Resultados semelhantes também foram descritos em outros estudos<sup>8,13</sup>.

### Inflamação

Uma reação inflamatória intensa foi confirmada por aumento dos níveis de IL-6, mieloperoxidase, malondialdeído e febre. As concentrações séricas de IL-1 $\beta$ , a principal citocina relacionada com expressão da óxido nítrico sintase induzível e adesão de leucócitos ao endotélio<sup>20</sup>, foram imensuráveis em todos os grupos. A ausência de IL-1 $\beta$  seria impraticável e irracional, porque, juntamente com fator de necrose tumoral- $\alpha$ , é um dos "gatilhos" principais e amplificador de inflamação<sup>21</sup>. Níveis não detectáveis de IL-1 $\beta$  podem ser elemento identificador de modelos experimentais independentes do óxido nítrico. O valor médio de zero poderá refletir problemas metodológicos, que são difíceis de serem avaliados, haja vista que foi assegurada manipulação ade-

quada das amostras e ensaios apropriados. As concentrações séricas elevadas de IL-6 no grupo PA representam ferramenta adequada de prognóstico<sup>21</sup>. A administração preventiva do AM reduziu as concentrações de IL-6, mas os valores permaneceram acima dos níveis de controle, sugerindo que um efeito anti-inflamatório sistêmico, ainda que leve, pode ser atribuído à inibição da guanilato ciclase solúvel induzida pelo azul. A hipertermia é reação à liberação de mediadores inflamatórios, especialmente IL-6, que promovem a liberação de pirógenos endógenos<sup>22</sup>. Esta é a característica principal da resposta inflamatória observada em todos os grupos sujeitos a PA, que coincidiu com maior expressão de malondialdeído. O azul de metileno não impediu a hipertermia, no presente estudo, apesar dos seus bem conhecidos efeitos antioxidantes<sup>23</sup>.

A atividade aumentada da mieloperoxidase, que reflete maior neutrofilia, foi observada nos grupos PA e AM+PA. Maior atividade dela tem sido associada com a administração de AM em um modelo de lesão de isquemia-reperfusão<sup>24,25</sup>. No entanto, no presente estudo, não houve efeito estimulante da administração do AM na atividade mieloperoxidase.

A pancreatite aguda associa-se à intensa ativação de enzimas inflamatórias e à indução de mediadores que causam o aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de plasma, edema, e perda de fluidos para o terceiro espaço denominado ascite pancreática. A amilase, um indicador fiável desse aumento de permeabilidade da membrana, aumentou acentuadamente no presente estudo, onde as observações post-mortem indicam que o pâncreas era a única fonte do extravasamento, com a acumulação de volume significativo. A redução de 28% do volume acumulado visto no grupo AM+PA pode ser atribuível



à inibição da guanilato ciclase solúvel pelo azul. Ascite pancreática é uma fonte importante de substâncias tóxicas e vasoativas<sup>26</sup>, e que pode estar relacionada com a inflamação remota e complicações pancreáticas. A redução do volume observado no presente estudo não foi associada com a melhor evolução da doença. A análise peritoneal revelou possível correlação entre a gravidade da pancreatite e disseminação da inflamação para tecidos extrapancreáticos.

### Peroxidação lipídica

A infusão de AM aumentou o malondialdeído, confirmando estudos anteriores destes autores que utilizaram o mesmo modelo suíno. O azul de metileno impede a formação de superóxido e a sua capacidade de funcionar como um aceitador final de elétrons a partir de diferentes locais de oxidação<sup>8</sup>. Na verdade, o azul apresenta efeitos antioxidantes, mas tem característica redox. Em concentrações no plasma maiores do que 5µM, que são facilmente obtidos com doses clínicas de AM de 1,5-2mg/kg, aumentam a captura de espécies de oxigênio, a geração de radicais livres, bem como, o consumo de fatores de antioxidantes, como a glutatona<sup>27</sup>. Outros determinantes da atividade redox do azul são o modelo experimental, o regime de doses, e a simples premissa de que o AM é um promotor da peroxidação lipídica.

Em conclusão, a indução deste tipo de pancreatite aguda causou repercussões sistêmicas gravíssimas. A progressão da doença levou o organismo à exaustão. A adoção de um modelo de indução gradual e lenta de pancreatite, associado ao aumento da liberação de óxido nítrico podem permitir a observação de efeitos benéficos do AM. Por agora, no entanto, a utilização dele é inadequada no caso de liberação não exponencial de óxido nítrico e muito cuidado deve ser tomado, dado o aumento na peroxidação lipídica. Alguns dos seus efeitos benéficos, incluindo diminuição do volume de ascite e retardo no aumento dos níveis de amilase, não justificam o uso do AM na pancreatite fulminante. A liberação constante fisiológica de óxido nítrico é um modulador potente do tono vasomotor e a inibição de seus efeitos biológicos pode ter consequências negativas, especialmente na microcirculação. Além disso, o estudo sustenta o conceito de que o AM atua em situações de excesso de produção de óxido nítrico, semelhantes às observadas na sepse, anafilaxia e síndrome vasoplégica associada à circulação extracorpórea.

### Agradecimentos

Os autores agradecem a assistência técnica do Laboratório de Bioquímica, Departamento de Anatomia e Cirurgia, e do Laboratório de Dor e Inflamação do Departamento de Farmacologia da UFMG.

## A B S T R A C T

**Objective:** To study the therapeutic application of guanylate cyclase inhibition by methylene blue in an experimental model of acute pancreatitis in pigs. **Methods:** acute necrotizing pancreatitis was induced in anesthetized pigs by the retrograde infusion of 1 ml/kg of 5% sodium taurocholate and 8 U/kg enterokinase in the pancreatic duct. Three groups were studied (n = 5): control (C), pancreatitis (AP), and MB bolus followed by pancreatitis (MB+P). The data included serum and abdominal fluid enzymes, hemodynamic variables, arterial hemogasometry, abdominal fluid volume, inflammatory markers, plasma nitrite/nitrate (NOx), plasma myeloperoxidase (MPO) and plasma malondialdehyde (MDA). One- and two-way analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by the Bonferroni test ( $p < 0.05$ ). **Results:** amylase and lipase were three and 10-fold higher in the AP group. Myeloperoxidase activity was 50% higher in the AP group. The hemodynamic data indicated early hypovolemic shock followed by cardiogenic shock. Severe fluid translocation to the peritoneal cavity was observed. Plasma NOx remained unchanged. The MB+P group had a five-fold increase in MDA compared with the C group. **Conclusion:** preemptive application of MB in pigs with AP demonstrated no significant effects on hemodynamic and inflammatory variables. The use of MB is inadequate in cases of exponential NO release, and extreme caution must be exercised, given the increase in lipid peroxidation based on the malondialdehyde dosage.

**Key words:** Pancreatitis. Nitric oxide. Free radicals Methylene blue. Guanylate cyclase.

## REFERÊNCIAS

- Pastor CM, Suter PM. Evidence that humans produce less nitric oxide than experimental animals in septic shock. *Crit Care Med*. 1998;26(6):1135.
- Evora PR, Ribeiro PJ, de Andrade JC. Methylene blue administration in SIRS after cardiac operations. *Ann Thorac Surg*. 1997;63(4):1212-3.
- Evora PR. Should methylene blue be the drug of choice to treat vasoplegias caused by cardiopulmonary bypass and anaphylactic shock? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000;119(3):632-4.
- Buzato MA, Viaro F, Piccinato CE, Evora PR. The use of methylene blue in the treatment of anaphylactic shock induced by compound 48/80: experimental studies in rabbits. *Shock*. 2005;23(6):582-7.
- Evora PR, Simon MR. Role of nitric oxide production in naphylaxis and its relevance for the treatment of anaphylactic hypotension with methylene blue. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2007;99(4):306-13.
- Meirelles RF Jr, Ceneviva R, Viaro F, Baldo CF, Evora PR. Methylene blue improves hemodynamic shock but increases lipoperoxidation in severe acute pancreatitis pig model. *Acta Cir Bras*. 2008;23 Suppl 1:8-16; discussion 16.
- Laukkanen JM, Van Acker GJ, Weiss ER, Steer ML, Perides G. A mouse model of acute biliary pancreatitis induced by retrograde pancreatic duct infusion of Na-taurocholate. *Gut*. 2007;56(11):1590-8.
- Li W, Yan X, Wang H, Zhang Z, Yu W, Ji D, et al. Effects of continuous high-volume hemofiltration on experimental severe acute pancreatitis in pigs. *Pancreas*. 2007;34(1):112-9.

9. Dugernier TL, Laterre PF, Wittebole X, Roeseler J, Latinne D, Reynaert MS, et al. Compartmentalization of the inflammatory response during acute pancreatitis: correlation with local and systemic complications. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(2):148-57.
10. Dimagno MJ, Williams JA, Hao Y, Ernst SA, Owyang C. Endothelial nitric oxide synthase is protective in the initiation of caerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287(1):G80-7.
11. Ozturk F, Gul M, Esrefoglu M, Ates B. The contradictory effects of nitric oxide in caerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Free Radic Res*. 2008;42(4):289-96.
12. Bachetti T, Pasini E, Suzuki H, Ferrari R. Species-specific modulation of the nitric oxide pathway after acute experimentally induced endotoxemia. *Crit Care Med*. 2003;31(5):1509-14.
13. Yekebas EF, Strate T, Zolmajd S, Eisenberger CF, Erbersdobler A, Saalmüller A, et al. Impact of different modalities of continuous venovenous hemofiltration on sepsis-induced alterations in experimental pancreatitis. *Kidney Int*. 2002;62(5):1806-18.
14. Lefer AM, Glenn TM, O'Neill TJ, Lovett WL, Geissinger WT, Wangenstein SL. Inotropic influence of endogenous peptides in experimental haemorrhagic pancreatitis. *Surgery* 1971;69(2):220-8.
15. Ao L, Song Y, Fullerton DA, Dinarello CA, Meng X. The interaction between myocardial depressant factors in endotoxemic cardiac dysfunction: role of TNF-alpha in TLR4-mediated ICAM-1 expression. *Cytokine*. 2007;38(3):124-9.
16. Joulin O, Petillot P, Labalette M, Lancel S, Neviere R. Cytokine profile of human septic shock serum inducing cardiomyocyte contractile dysfunction. *Physiol Res*. 2007;56(3):291-7.
17. Meng X, Ao L, Song Y, Raeburn CD, Fullerton DA, Harken AH. Signaling for myocardial depression in hemorrhagic shock: roles of Toll-like receptor 4 and p55 TNF-alpha receptor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(3):R600-6.
18. Kumar A, Paladugu B, Mensing J, Kumar A, Parrillo JE. Nitric oxide-dependent and -independent mechanisms are involved in TNF-alpha-induced depression of cardiac myocyte contractility. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;292(5):R1900-6.
19. Kelm M, Schäfer S, Dahmann R, Dolu B, Perings S, Decking UK, et al. Nitric oxide induced contractile dysfunction is related to a reduction in myocardial energy generation. *Cardiovasc Res*. 1997;36(2):185-94.
20. Merx MW, Weber C. Sepsis and the heart. *Circulation*. 2007;116(7):793-802.
21. Leszczynski D, Josephs MD, Foegh ML. IL-1 beta-stimulated leucocyte-endothelial adhesion is regulated, in part, by the cyclic-GMP-dependent signal transduction pathway. *Scand J Immunol*. 1994;39(6):551-6.
22. Jambrik Z, Gyöngyösi M, Hegyi P, Czakó L, Takács T, Farkas A, et al. Plasma levels of IL-6 correlate with hemodynamic abnormalities in acute pancreatitis in rabbits. *Intensive Care Med*. 2002;28(12):1810-8.
23. Riedel W, Lang U, Oetjen U, Schlapp U, Shibata M. Inhibition of oxygen radical formation by methylene blue, aspirin, or alpha-lipoic acid, prevents bacterial-lipopolysaccharide-induced fever. *Mol Cell Biochem*. 2003;247(1-2):83-94.
24. Salaris SC, Babbs CF, Voorhees WD 3rd. Methylene blue as an inhibitor of superoxide generation by xanthine oxidase. A potential new drug for the attenuation of ischemia/reperfusion injury. *Biochem Pharmacol*. 1991;42(3):499-506.
25. İlhan H, Alatas O, Tokar B, Çolak O, Pa'ao'lu O, Koku N. Effects of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody, allopurinol, and methylene blue on intestinal reperfusion injury. *J Pediatr Surg*. 2003;38(11):1591-5.
26. Sugimoto M, Takada T, Yasuda H, Nagashima I, Amano H, Yoshida M, et al. The lethal toxicity of pancreatic ascites fluid in severe acute necrotizing pancreatitis. *Hepatogastroenterology*. 2006;53(69):442-6.
27. May JM, Qu ZC, Cobb CE. Reduction and uptake of methylene blue by human erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;286(6):C1390-8.

Recebido em 10/10/2012

Aceito para publicação em 13/12/2012

Conflito de interesse: nenhum.

Fonte de financiamento: FAEPA / Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e CAPES.

#### Como citar este artigo:

Baldo CF, Capellini VK, Celotto AC, Sônego F, Tirapelli LF, Batalhão M, Cárnio EC, Santos JS, Évora PRB. Inibição da guanilato ciclase pelo azul de metileno no choque circulatório causado por pancreatite aguda necrosante: uma palavra de cuidado embasada em modelo suíno. *Rev Col Bras Cir*. [periódico na Internet] 2013;40(6). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>

#### Endereço para correspondência:

Paulo Roberto Barbosa Évora

E-mail: [prbevara@gmail.com](mailto:prbevara@gmail.com)