Estudo piloto do papel do probucol na proteção da lesão pulmonar induzida pela administração de doxorrubicina em ratos – análise comparativa entre microscopia óptica e microscopia eletrônica

Pilot study of probucol protection on pulmonary injury induced by doxorubicin in rats – comparison analysis between optic and eletronic microscopy

AIRTON SCHNEIDER – Doutor. Professor e Chefe do Serviço de Cirurgia Torácica da ULBRA.
ROBERTA MAGALHÃES – Acadêmica de Medicina da ULBRA. Residente de Cirurgia Geral da ULBRA.
CAROLINE MACHADO – Acadêmica da Medicina da ULBRA. Residente de Psiquiatria do HCPA.
MARTA HUBNER – Acadêmica de Medicina da ULBRA.
MARIANA PONTAL – Acadêmica de Medicina da ULBRA.
FERNANDA PANTE – Acadêmica de Medicina da ULBRA.
MARCIA GRAUDENZ – Patologista do Instituto de Patologia de Porto Alegre.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

✉ Endereço para correspondência:
Airton Schneider
Rua Cel.Bordini 896/402
90440-003 – Porto Alegre, RS – Brasil
☎ (51) 3346-8590 / 9117-9422
airtonsc@terra.com.br

RESUMO

Objetivo: Estudar o papel do probucol na lesão pulmonar obtida pela administração de doxorrubicina em ratos. **Método:** foi realizado um estudo piloto experimental, onde o probucol foi testado como protetor da injúria pulmonar obtida pela administração de doxorrubicina em ratos. **Resultados:** Na análise comparativa dos grupos, estudados por microscopia óptica, não houve diferença significativa de critérios previamente definidos, exceto pelo edema pleural ($p < 0,05$). Já na microscopia eletrônica, a agressão da doxorrubicina foi identificada através da desorganização estrutural. No grupo que recebeu probucol e doxorrubicina, não foi observada a mesma desorganização ($p < 0,05$). **Conclusões:** os resultados deste estudo piloto sugerem que o probucol exerceu um efeito protetor no tecido pulmonar agredido pela doxorrubicina e que a microscopia eletrônica é mais sensível na identificação de critérios de injúria pulmonar decorrente da exposição à doxorrubicina.

UNITERMOS: Injúria Pulmonar, Proteção Pulmonar.

ABSTRACT

Objective: *To study the role of probucol in the pulmonary injury caused by doxorubicin in rats.* ***Methods:*** *An experimental study was carried out to verify where the probucol was protective of the pulmonary injury caused by the administration of doxorubicin in rats.* ***Results:*** *In the comparative analysis of the groups studied by optic microscopy, it did not have significant difference in pre-definite criterions, except for pleural edema ($p < 0,05$). In eletronic microscopy, the aggression of the doxorubicin was indicated through the structural disorganization. In the group that received probucol and doxorubicin was not observed the same disorganization ($p < 0,05$).* ***Conclusion:*** *The results suggest that the probucol was effective in the protection of pulmonary injury caused by doxorubicin and that the eletronic microscopy is more sensitive for pre-definite criterions of pulmonary injury.*

KEYWORDS: *Pulmonary Injury, Pulmonary Protection.*

INTRODUÇÃO

A doxorrubicina é um dos fármacos mais eficazes no tratamento de sarcomas de partes moles. (1, 2, 3). Contudo, o efeito da doxorrubicina é limitado, devido a sua toxicidade dose-dependente (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). Essa toxicidade, que afeta principalmente coração e pulmões (2), pode ser explicada pela agressão direta a enzimas e por seu dano indireto, através da produção de radicais livres (1, 2, 4) e conseqüente aumento da peroxidação lipídica (4).

Apesar do tratamento principal para os pacientes com metástases pulmonares de sarcoma ser a ressecção completa (10), esta promove apenas 25% de sobrevida em cinco anos, mesmo associada à quimioterapia (3, 10, 11, 12). Estudos sugerem que se a dose de doxorrubicina pudesse ser maior, essas metástases seriam menos freqüentes (7).

Muitos pesquisadores têm-se dedicado a esclarecer a propriedade antioxidante do probucol quando em uso combinado a quimioterápicos, como a doxorrubicina, na proteção da injúria tecidual.

O probucol é uma droga antilipidêmica e antioxidante (4, 13) que parece modular o déficit antioxidante causado pela doxorrubicina, sem, entretanto, interferir no seu efeito antitumoral (2, 4).

Este estudo piloto tem o intuito de verificar a ação do probucol na proteção do pulmão da toxicidade causada pela doxorrubicina em ratos. Para isso, serão utilizados microscopia óptica e eletrônica, com critérios de lesão teci-

Recebido: 23/2/2007 – Aprovado: 19/11/2007

12-75-estudo piloto do papel do probucol.pmd 275 9/1/2008, 10:37

dual previamente definidos. Um resultado positivo indicaria que o acréscimo de probucol ao quimioterápico permitiria aumentar a dose, sem gerar maior toxicidade para o paciente.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 25 ratos Wistar, machos, pesando entre 200 e 350 g para análise em microscopia óptica (MO), e seis ratos Wistar, machos, pesando entre 200 e 350 g para análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Os animais foram tratados segundo normas do "*Guide for Care and Use of Animals*" 5 e de acordo com a Lei 6.638, de 8 de maio de 1979, além do *Manual para Técnicas de Biotério* 6, que regulamenta cuidados mínimos e dignos para animais de experimentação, tendo orientações preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Durante o experimento, os animais ficaram em gaiolas coletivas com no máximo cinco animais por gaiola, em temperatura entre 22 e 24°C, com oferta de água e comida à vontade.

A anestesia dos animais foi feita com pentabarbital sódico na dose de 30mg/kg de peso por via intraperitoneal complementada com lidocaína 2% sem vasoconstritor no local da incisão.

Antes de cada procedimento, todos os ratos foram pesados em balança eletrônica individualmente.

A doxorrubicina foi administrada por via endovenosa, canulando-se a veia jugular interna do rato.

O probucol foi administrado via intraperitoneal.

No 21º dia, todos os ratos analisados pela MET foram submetidos a eutanásia com dose elevada de barbitúricos e os ratos analisados pela MO foram decapitados.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFRGS.

No estudo através da microscopia óptica (MO), 25 ratos foram divididos em três grupos.

O primeiro, com sete ratos, o segundo, com dez ratos e o terceiro, com oito ratos (Tabela 1).

A técnica utilizada para análise das peças pulmonares baseou-se na preparação histológica com hematoxilina & eosina, analisadas por apenas um único profissional qualificado sem que este soubesse dados do animal.

Foram analisados dez parâmetros de lesão do tecido pulmonar previamente estabelecidos (Tabela 2), divididos em quatro níveis de gravidade: 0-ausente, 1-leve, 2-moderada e 3-severa. A análise estatística dos ratos estudados através da MO baseou-se no teste qui-quadrado, considerando-se estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

Na análise através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), foram utilizados seis ratos, também divididos em três grupos de dois ratos cada, de acordo com as drogas recebidas (Tabela 1). A análise estatística utilizada foi o teste t de Student, considerando significativo $p < 0,05$. A análise foi feita através de imagens obtidas em comparação com imagens-controle. Estas foram obtidas a partir de pleuras de ratos não submetidos a qualquer procedimento além da biópsia, livres da ação das drogas em estudo.

A análise baseou-se na organização estrutural do interstício pulmonar – células, fibras e espaços, sendo sua desorganização considerada injúria pulmonar. Características de alterações ultra-estruturais também foram observadas, como edema mitocondrial, vacuolização citoplasmática, formação de lisossomos e dilatação do sistema sarcotubular (Tabela 4). Esses critérios também foram estabelecidos previamente.

A coleta do material foi realizada de acordo com as normas do Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

Tabela 1 – Esquema de administração de fármacos

	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Dia 1	–	Probucol intraperitoneal	Probucol intraperitoneal
Dia 7	Doxorrubicina IV	–	Doxorrubicina IV
Dia 14	–	Probucol Intraperitoneal	Probucol Intraperitoneal
Dia 21	Sacrifício dos ratos e retirada do bloco coração-pulmão		

Dose probucol: 10mg/kg
Dose doxorrubicina: 3mg/kg

Tabela 2 – Critéios de lesão tecidual para MO

Critérios histológicos para análise do pulmão na MO
1. Congestão vascular
2. Edema alveolar
3. Edema subpleural
4. Hemorragia alveolar
5. Necrose epitelial alveolar
6. Necrose epitelial brônquica
7. Necrose endotelial
8. Pneumonia intersticial
9. Pleurite
10. Hemorragia brônquica

Tabela 3 – (Resultados MET)

Achados/Grupo	Grupo I	Grupo II	Grupo III	p
Edema mitocondrial	+	–	+	< 0,05
Vacuolização citoplasmática	+	–	–	> 0,05
Corpos lisossomiais	+	–	–	> 0,05
Dilatação do sistema sarcotubular	–	–	–	> 0,05

12-75-estudo piloto do papel do probucol.pmd 276 9/1/2008, 10:37

Tabela 4 – Critérios de avaliação da lesão tecidual – ME

Características da injúria tecidual avaliada na MET
1. Edema mitocondrial
2. Vacuolização citoplasmática
3. Formação de lisossomos
4. Dilatação do sistema sarcotubular

As doses de cada droga, via de administração, bem como os dias em que foram administradas, tanto no grupo a ser estudado pela MO quanto MET, foram idênticos (Tabela 1).

Dois ratos receberam apenas anestésico e foram observados pelo mesmo período dos demais animais para controle ambiental da análise anatomopatológica através da MO (grupo-controle).

Todas as avaliações, tanto na MO quanto na ME, foram realizadas por pesquisadores sem a informação do tipo de material a ser avaliado, mantendo critérios de comparação ao tecido normal obtido por animais-controle.

RESULTADOS

No estudo realizado com MO, os resultados analisaram as seguintes variáveis: congestão pulmonar, edema alveolar, edema subpleural, hemorragia alveolar, necrose epitelial alveolar e hemorragia brônquica.

Na análise comparativa dos três grupos, não houve diferença significativa nas variáveis, exceto pela variável correspondente ao edema pleural, que apresentou diferença estatística entre os três grupos ($p < 0.05$) (Figura 1).

Na análise por microscopia eletrônica, a agressão da doxorrubicina foi indicada através do aumento do tamanho mitocondrial, vacuolização do citoplasma, formação de corpos mitocondriais e dilatação do sistema sarcotubular. A comparação das imagens dos diferentes grupos mostrou diferença na organização intra-estrutural com $p< 0,05$, exceto pelo edema mitocondrial, quando comparado a um pulmão normal. Foi observada maior desorganização de estrutura no grupo que recebeu apenas doxorrubicina. Esse grupo apresentou aumento mitocondrial e vacuolização citoplasmática com formação de lisossomos (Figura 2 e 3).

No grupo que recebeu a associação probucol e doxorrubicina, não foi observada a mesma desorganização. Esse grupo mostrou apenas aumento do tamanho mitocondrial. O grupo em que foi administrado apenas probucol mostrou-se bastante semelhante ao grupo-controle, não apresentando nenhuma das características citadas ($p,< 0.05$) (Figura 4).

DISCUSSÃO

Siveski-Ilikovic et al., em 1985, demonstrou que o probucol, quando aplicado anteriormente ao uso da doxorrubicina, aumenta as defesas antioxidantes, preparando o tecido cardíaco para o estresse oxidativo induzido pela doxorrubicina (4). Apesar de os resultados não mostrarem o benefício esperado e encontrado por Siveski-Ilikovic, foi observado que, no momento da extirpação dos pulmões, os ratos do grupo que recebeu apenas doxorrubicina apresentavam maior edema pulmonar e mais aderências pleuro-pulmonares.

Em 2000, Timoa Li et al. relataram que o probucol oferece uma proteção parcial quando usado em conjunto no tratamento com a doxorrubicina. Porém, há estudos que mostram uma proteção total quando esse for iniciado duas semanas antes do tratamento com

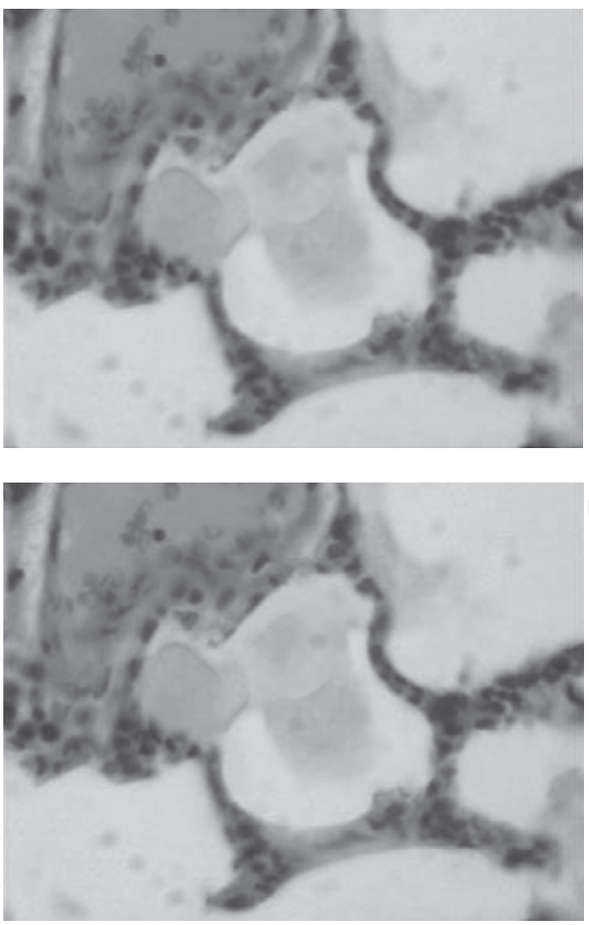


Figura 1 – Microscopia óptica: Edema subpleural (a e b), aumento 500x.

12-75-estudo piloto do papel do probucol.pmd 277 9/1/2008, 10:37

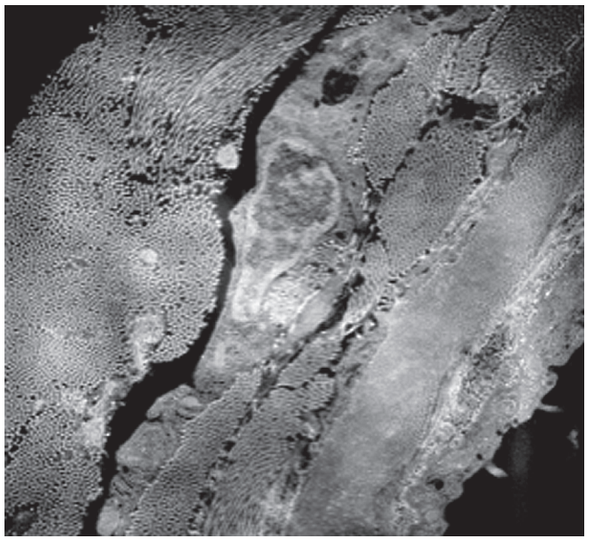


Figura 2 – Microscopia eletrônica – Pulmão normal – controle-aumento 10000x.

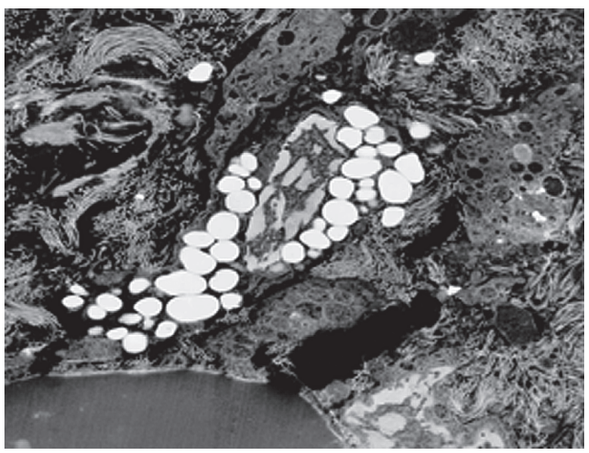


Figura 3 – Microscopia eletrônica – Doxorrubicina – aumento 10000x – intensa desorganização estrutural.

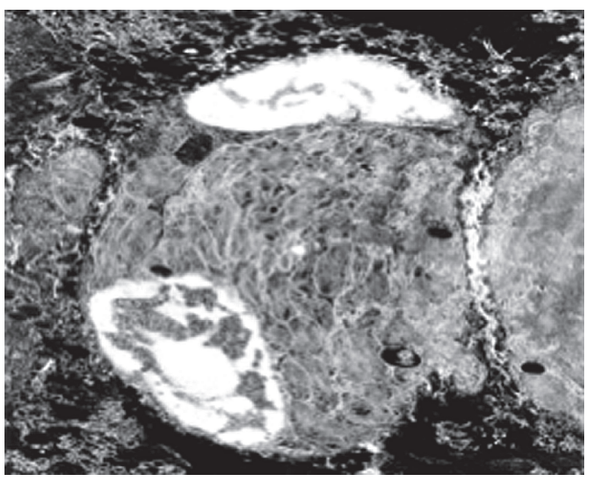


Figura 4 – Microscopia eletrônica – Doxorrubicina e probucol – aumento 10000x – preservação da estrutura pulmonar.

o quimioterápico, sugerindo que a sua proteção varie conforme o tempo de exposição a essa droga (2, 13).

Sabe-se também que os antioxidantes melhoram o efeito da remodelação ventricular, normalizando os índices de estresse oxidativo através da dosagem de peptídios circulantes. Isso faz com que ocorra melhora hemodinâmica, redução na atividade neuro-humoral e diminuição da congestão pulmonar, como relata o trabalho realizado por Amir Abolhoda et al. em 1997 (9).

Os efeitos protetores descritos de antioxidantes em relação ao coração não se comprovam em relação ao pulmão quando observado por MO. Essa possibilidade sugere que a hematoxilina e eosina na MO não seja o melhor método para avaliar a injúria pulmonar.

Sabe-se que a doxorrubicina promove a produção de radicais livres e o probucol, por sua vez, melhora a reserva de antioxidante endógena (4, 14, 15, 16). Isso sugere que o probucol promova a proteção da estrutura tecidual e, conseqüentemente, sua função.

Timoa et al., em 2000, e Bilenko, em 2004, relataram que a proteção do probucol é diretamente proporcional ao tempo de exposição ao mesmo. A proteção parcial no tratamento paralelo e total no tratamento concomitante pode-se dar pelo esforço das defesas antioxidantes e melhor preparo para o estresse oxidativo produzido pela doxorrubicina (2, 16).

Segundo a análise de MET, o desenvolvimento de lesão pulmonar induzida pela doxorrubicina foi estabelecido por dano na estrutura do parênquima. O probucol foi identificado como protetor dessa injúria.

Pode-se observar que o probucol exerceu um efeito protetor esperado em nível pulmonar. Isso pode ser explicado, provavelmente, quando observamos que os radicais livres produzidos pela doxorrubicina acarretam menor lesão nos pulmões onde havia sido associado probucol em relação àquele sem probucol.

Os resultados obtidos neste trabalho piloto permitem formular duas conclusões: a primeira é que o pro-

12-75-estudo piloto do papel do probucol.pmd 278 9/1/2008, 10:37

bucol exerceu um efeito protetor da lesão pulmonar produzida por doxorrubicina em ratos. Como segunda conclusão, é possível afirmar que a microscopia óptica não é sensível para identificar alterações produzidas por doxorrubicina em pulmões de ratos, sendo a microscopia eletrônica mais eficaz na identificação de lesões estruturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Timoa LI, Pawan K. Singal TL. Adriamycin-Induce Early Changes in Myocardial Antioxidant Enzymes and Their Modulation by Probucol. Circulation 2000; 102:2105-110.
2. Timao LI, Danelisen I, Belló-Klein A, Pawan K, Singal TL. Effect of probucol on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induce cardiomyopathy in rats. Cardiovascular Research 2000; 46:523-530.
3. Bruce NG, Hochwald SN, Burt ME. Isolated Lung Perfusion With Doxorubicin Reduce Cardiac and Host Toxicities Associated With Systemic Administration. Ann Thorac Surg 1996; 61:969-972.
4. Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow DA, Singal TL. Probucol Protects Against Adriamycin Cardiomyopathy Without Interfering with Its Antitumor Effect. Circulation 1995; 91:10-15.
5. Wang HY,Bruce NG, Blumberg D,Port JL,Hochwald SN,Burt ME. Pulmonary Artery Perfusion of Doxorubicin With Blood Flow Occlusion: Pharmacokinetics and Treatment in a Metastatic Sarcoma Model. Ann Thorac Surg 1995; 60:1390-1394.
6. Pawan K, Singal TL, Iliskovic N. Doxorubicin-Induce Cardiomyopathy. The New England Journal of Medicine 1998;13:900-905.
7. Burt ME, Liv D, Abolhada A, Ross HM, Kaneda Y, Jara E, Casper ES, Ginsberg RJ, Brennam MF. Isolated Lung Perfusion for Patients With Unresectable Metastases From Sarcoma: A Phase I Trial. Ann Thorac Surg 2000;69:1542-9.
8. Lankin VZ, Tikhaze AK, Kukharchuk VV, Konovalova VVK, Pisarenko OI, Kaminnyi AI,Shumreu KB, Belenkov IN. Antioxidants decreases the intensification of low density lipoprotein in vivo peroxidation during therapy with statins. Molec and Cell Biochem 2003;249:129-140.
9. Abolhoda A, Brooks A, Nawata S, Kaneda Y, Chong H, Burt ME. Isolated Lung Perfusion With Doxorubicin Prolongs Survival in a Rodent Model of Pulmonary Metastases. Ann Thorac Surg 1997; 64:181-184.
10. Casson AG, Putnam JB, Natarajan G, Johnston DA, Mountain C, McMurtrey M, Roth JA. Five year survival after pulmonary metastasectomy for adult soft tissue sarcoma. Cancer 1992; 69:662-8.
11. Mikulic D, Ilic J, Cepulic M, Gilgenic JS, Orlic D, Zupanic B, Fattorini I, Seiwerth S. Angiogenesis and Ewing sarcoma-relationship to pulmonary metastasis and survival. J Pediatr Surg 2006; 41:524-529.
12. Weeler RH, Ensminger WD, Thall JH, Anderson JL. High-dose doxorubicin: an exploration of the dose-response curve in human neoplasia. Cancer treat Rep 1982; 66: 493-498.
13. Kim DS, Kim HP, Woo ER, Kwon DU, Kim MS, Chao SW, Chae HJ. Protective effect of calceolarioside on adriamycin indiced cardiomyocite toxicity. Eur J Pharmacol 2006;54:24-32.
14. Sia, Ying, Tung L, Nathalie M, Parker TG, Tsoporis JN, Deschepper CF, Calderone A, Pourdjabbar A, Jasmin JF, Sarrazin JF, Liu P, Adam A, Butany J, Rouleau J Beneficial Effects of Long-Term use of the Antioxidant probucol in Heart Failure in the rat. Circulation 2002; 105: 2549-2555.
15. Sireski IN, Hill M, Chow S, Singal PK. Probucol against adriamycin cardiomyophaty without interfering with its antitumor effect. Circulation 1995; 91:1, 10-5.
16. Bilenkom V, Khilchencon AV, Konovalova GC, Lankin VZ. Effect of antioxidant probucol in cell-nucleaded LDL oxidation in vitro and in vivo. Bulletin of experimental Biology and Medicine 2004; 136: 126-128.

12-75-estudo piloto do papel do probucol.pmd 279 9/1/2008, 10:37