

EVALUACIÓN DE POTENCIAL ALTERNATIVA TERAPÉUTICA FRENTE A UN CUADRO SÉPTICO TEMPRANO

Julieta Ronchi¹ (julironchi@hotmail.com), **Gabriela Olea**¹ (gbolea@gmail.com), **Luis Huespe**² (dythe_hescuela@hotmail.com), **María Victoria Aguirre**¹ (vikyaguirre@yahoo.com), **Tania Romina Stoyanoff**¹ (taniastoyanoff@gmail.com)

1. Departamento de Bioquímica- Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas (LIBIM)-Facultad de Medicina.
2. Hospital Escuela "Gral José Francisco de San Martín". Centro de Investigaciones Clínicas

RESUMEN

La sepsis se define como una disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta desregulada del huésped a la infección. Es causa principal de morbimortalidad y los avances en la comprensión de esta problemática, no se tradujeron en progresos terapéuticos. La dexmedetomidina (DEX) es un fármaco indicado para sedación ligera de pacientes y se ha visto que podría resultar benéfico en cuadros sépticos. Aún resta dilucidar los potenciales efectos beneficiosos de la DEX en sepsis, así como los mecanismos de acción involucrados. El objetivo de esta investigación fue evaluar los efectos de la administración de DEX en un modelo preclínico de sepsis inducida por endotoxemia. Ratones machos Balb-C fueron divididos en cuatro grupos experimentales (n=3/grupo): Grupo I, grupo control inyectados con solución (Sol.) Salina estéril por vía intraperitoneal (i.p.); Grupo II, inyectados con lipopolisacárido (LPS O157:B7; 8 mg/kg, i.p.); Grupo III, Control + DEX, inyectados con DEX 50 µg/kg en 1 dosis i.p.; Grupo IV, LPS + DEX, inyectados con DEX 50 µg/kg en 1 dosis i.p. media hora antes del LPS. A las 24 horas post LPS se determinaron parámetros bioquímicos y del medio interno, así como alteraciones histopatológicas renales, pulmonares y hepáticas (H/E). El grupo IV mostró una mejora significativa tanto en la función renal ($p < 0,01$) como en biomarcadores sistémicos de sepsis. La administración de DEX mejoró tanto la extensión como la severidad de los cambios histopatológicos en relación al grupo LPS. Estos resultados preliminares indican que DEX posee efectos protectivos frente la sepsis y la sitúan como un potencial agente terapéutico.

Palabras clave: Dexmedetomidine / Lipopolysaccharide / Sepsis.

SUMMARY

Sepsis and septic shock are characterized by life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection. They are common and fatal disorders, representing the major determinant of morbidity and mortality in intensive care units (ICU). This highlights the importance of the study of new therapeutic strategies to mitigate these effects. Dexmedetomidine (DEX) is a common sedative drug used in the intensive care unit and several evidences have shown that may induce a variety of cytoprotective effects on early sepsis. In this study, we aimed to evaluate the protective effect of DEX on a murine model of lipopolysaccharide (LPS) induced-endotoxemia by histological and biochemical examinations. Male inbred Balb/c mice were divided into four experimental groups: I) Control; II) LPS (8 mg/kg, i.p.), III) DEX (50 µg/kg, i.p.) and IV) DEX+LPS. Histopathological analyses for renal, pulmonary and hepatic tissues, and biochemical determinations were performed at 24h post LPS administration. DEX+LPS group showed a significant improvement in renal function, as well as, a significant attenuation of histopathological alterations induced by LPS from 24 hs. Our data revealed that DEX treatment remarkably improving metabolic acidosis and hypoglycemia. This study demonstrates that DEX exerts protective effects on kidneys, liver and lungs in endotoxemic mice. Further in vivo studies will be performed to determine the molecular mechanisms involved in these improvements.

key words: Dexmedetomidine / Lipopolysaccharide / Sepsis.

INTRODUCCIÓN

La sepsis debe definirse como una disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta desregulada del huésped a la infección. Es una causa principal de enfermedad grave y de mortalidad en el mundo. Es un síndrome caracterizado por fiebre, hipotensión, hiperlactacidemia, coagulopatía, inflamación excesiva, hasta falla multiorgánica⁽¹⁾. Si bien se han realizado avances en la comprensión de esta problemática, esto no se ha traducido de forma similar en progresos terapéuticos⁽²⁾. Por consiguiente, alternativas terapéuticas que mitiguen la respuesta pro-inflamatoria y muerte celular resultan ventajosas para reducir la falla multiorgánica. La dexmedetomidina (DEX) es un sedante indicado para mantener a los pacientes en sedación ligera, y puede disminuir el riesgo de delirio y acortar la duración de la ventilación mecánica comparada con las benzodiazepinas⁽³⁾. Se ha señalado que la DEX podría resultar especialmente beneficiosa en pacientes con sepsis, al poseer efectos antiinflamatorios y disminuir la disfunción diafragmática asociada a la sepsis, y estudios preliminares sugieren que los pacientes sépticos se beneficiarían más de este tratamiento que los pa-

cientes sin sepsis ⁽⁴⁾. Sin embargo, aún resta dilucidar los potenciales efectos beneficiosos del uso de DEX en la sepsis, como también los mecanismos moleculares subyacentes involucrados en estas acciones no clásicas. El estudio realizado estuvo focalizado en la descripción integral de fenómenos concurrentes en la progresión del cuadro séptico en un modelo pre-clínico de sepsis inducida por lipopolisacárido (LPS; 8 mg/kg) con el potencial efecto beneficioso de la administración de DEX (50µg/kg) en un protocolo de 24 hs de evolución.

Objetivo. Evaluar los efectos de la administración de Dexmedetomidina (DEX) en un modelo pre-clínico de sepsis inducida por endotoxemia

MATERIAL Y MÉTODOS:

Animales y diseño experimental: Se usaron ratones machos adultos isogénicos de la cepa Balb-C (26-28g) del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), mantenidos con dieta estándar y agua a demanda. Los procedimientos fueron aprobados ante el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina-UNNE. Ratones machos Balb-C fueron divididos en cuatro grupos experimentales (n=3/grupo): Grupo I, grupo control inyectados con Sol.Salina estéril ip.; Grupo II, inyectados con lipopolisacárido (LPS O157:B7; 8 mg/kg, ip.); Grupo III, Control + DEX, inyectados con DEX 50 µg/kg en 1 dosis i.p.; Grupo IV, LPS + DEX, inyectados con DEX 50 µg/kg en 1 dosis i.p. media hora antes del LPS. A las 24 hs post LPS, se observaron manifestaciones clínicas y los animales fueron anestesiados y eutinizados por dislocación cervical de acuerdo al procedimiento descrito en detalle anteriormente ⁽⁵⁾. Se obtuvieron muestras de sangre periférica por punción cardíaca y órganos (riñón, pulmón e hígado) en condiciones estériles para los análisis posteriores.

Determinación de parámetros bioquímicos de funcionalidad renal (creatinina sérica y uremia) con métodos colorimétricos Standart (Wiener Lab).

Determinación de Parámetros Hematológicos del Medio Interno. Las determinaciones de pH, concentraciones de Lactato, Glucemia y valores de oximetría se realizaron usando el analizador de gases en sangre Radiometer ABL 800 (Radiometer Ibérica SL).

Examen histológico de muestras renales, pulmonares y hepáticas. Los tejidos estudiados fueron fijados con formol bufferado (pH 7,4) y se sometieron a las técnicas histológicas de rutina. Los cortes fueron teñidos con Hematoxilina/Eosina (H/E) para posterior evaluación por microscopía óptica (Olympus BX40, Tokio, Japan) y fueron analizados por dos patólogos sesgados evaluando diez campos (x400) al azar.

Imágenes y análisis estadístico: Los resultados se analizaron utilizando el Software INSTAT 3.0 y PRISM versión 4.0 (GraphPad Software, U.S.A.) y se expresan como la media ± SD, considerando significativo un $p < 0.05$. Las imágenes digitalizadas fueron procesadas con Adobe Phothoshop 8.0.

RESULTADOS

Efecto de la DEX sobre el estado general y parámetros hematológicos del medio interno: Los animales sometidos a endotoxemia exhibieron clásicos signos de sepsis que incluyeron, pilo erección, taquipnea, diarrea, exudado peri orbital y letargia desde las primeras horas post inyección de LPS. La Figura (Fig.) 1 a y b ilustran las variaciones del pH sanguíneo y el hematocrito en los grupos experimentales. Tras la administración de LPS, los niveles de hematocrito descendieron drásticamente desde las 24 hs ($p < 0,001$). Esto revela la aparición de anemia relacionada con la inflamación desde las primeras 24 hs de iniciado el cuadro séptico. Los animales endotoxémicos tratados con DEX recuperaron valores de hematocrito similares al control. La disminución significativa del pH sanguíneo post endotoxemia evidenció una acidosis característica del cuadro ($p < 0,05$) y se observó como DEX restituye estos valores similares al control. La Fig. 1 c y d ilustran las variaciones del lactato y glucosa plasmática en este esquema experimental. Los análisis revelaron una importante disminución de la glucemia post LPS ($p < 0,001$), esto probablemente debido a que en estadios tempranos de la sepsis, tanto la hipoxia como la isquemia consecuente pueden activar la vía glucolítica, lo cual resulta en marcado consumo de glucosa y derivar en baja glucosa en plasma ⁽⁶⁾. Se observó como la administración de DEX mejoró significativamente el cuadro de hipoglucemia ($p < 0,05$). En la sepsis, los niveles de lactato plasmático son indicativos de hipoxia e hipoperfusión ⁽⁷⁾. Más aún, su aumento en pacientes es indicativo de peor pronóstico y mortalidad. Sin embargo, en este esquema experi-

mental, los niveles de lactato disminuyeron en las primeras 24 hs, en concordancia con estudios previos en modelos experimentales murinos ⁽⁶⁾. Adicionalmente, la administración de DEX no genera cambios significativos frente al control.

DEX mejora la funcionalidad renal tras endotoxemia. La Fig. 2 muestra como la injuria renal aguda inducida por endotoxemia causó una disminución significativa en la función renal manifestada por notable incremento de la creatininemia y uremia en comparación con animales controles ($p < 0,001$). La administración de DEX restauró significativamente la función renal en concordancia con otros estudios en diferente modelo experimental ⁽⁸⁾.

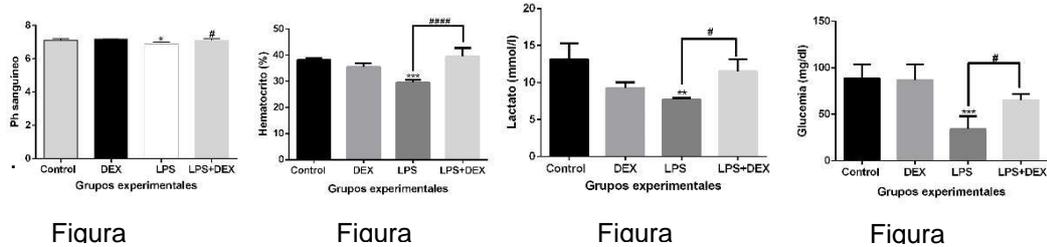


Figura 1. Efecto de la administración de DEX sobre los parámetros hematológicos del medio interno en la sepsis inducida por LPS (8mg/kg). Los resultados son expresados como la media \pm SD de tres experiencias diferentes. ANOVA y test de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ diferencias grupo LPS vs control. # $p < 0,05$; #### $p < 0,0001$ diferencias grupo LPS vs LPS+DEX.

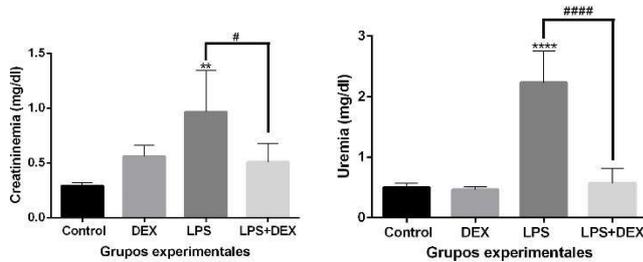


Figura 2. Efecto de la administración de DEX sobre la funcionalidad renal en la sepsis inducida por LPS (8mg/kg). Los resultados son expresados como la media \pm SD de tres experiencias diferentes. ANOVA y test de Bonferroni. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ diferencias grupo LPS vs control. # $p < 0,05$; #### $p < 0,0001$, diferencias grupo LPS vs LPS + DEX.

DEX atenúa las alteraciones histopatológicas renales, hepáticas y pulmonares tras endotoxemia

La Fig. 3 ilustra la histología y los cambios histopatológicos correspondientes a los tejidos renal, hepático y pulmonar de los grupos control, LPS y LPS más DEX, utilizando una tinción de hematoxilina-eosina.

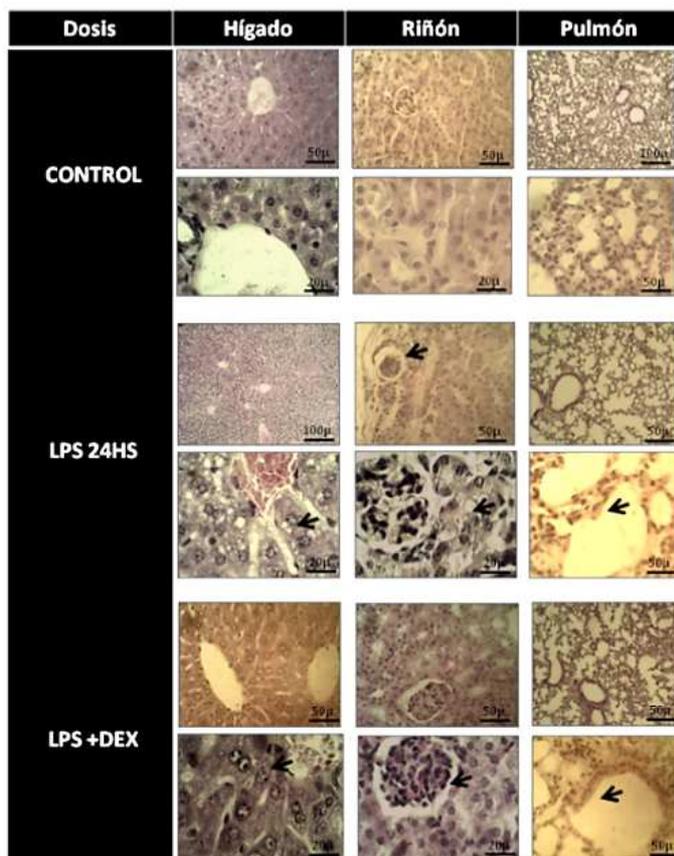


Figura 3. Efecto de la administración de DEX sobre la histología renal, pulmonar y hepática en la sepsis inducida por LPS (8mg/kg). En las imágenes visión panorámica del preparado (100x) y a mayor aumento (400x). En los tejidos controles se observó a) Hígado: estructuras lobulillares conservadas; b) Riñón: estructura glomerular y tubular normal, en 400x glomérulo rodeado por capsula de Bowman y epitelio cúbico con luz de aspecto regular en túbulos contorneados proximales (TCP); c) Pulmón: estructura y espacios alveolares conservados. En LPS 24 h se evidenció a) en tejido hepático un incremento de vacuolización celular con infiltrado inflamatorio (flecha); b) en riñón un aumento del espacio del Bowman (flecha) extensa vacuolización, como así también la presencia de núcleos compatibles con muerte celular; y c) en pulmón se observó un marcado infiltrado inflamatorio intersticial con adelgazamiento de la pared alveolar. En LPS + DEX 24 hs se aprecia la atenuación significativa de las alteraciones histopatológicas descritas tras la administración de DEX en todos los tejidos previamente mencionados. Líneas indican 50 μ m y 20 μ m respectivamente.

DISCUSIÓN

El presente estudio abarcó la descripción integral de fenómenos concurrentes en la progresión de un cuadro séptico experimental inducido por LPS (8 mg/kg) y la evaluación del potencial efecto beneficioso dado por la administración de DEX (50 µg/kg) en un protocolo de 24 hs de evolución. Actualmente, la sepsis debe definirse como una disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta desregulada del huésped a la infección ⁽²⁾. La sepsis es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en los pacientes hospitalizados. En la Argentina existen pocos datos relacionados a la incidencia de sepsis, las características de los pacientes y el pronóstico. Se estima que se producen 100.000 casos por año de sepsis en adultos y chicos, de los cuales la mortalidad ronda cerca de 45 mil ⁽⁹⁾. Más aún, los pacientes que sobreviven a la sepsis con frecuencia sufren problemas físicos, psicológicos y cognitivos prolongados. Por lo tanto, aunque se han realizado muchos avances en la comprensión de esta problemática de incidencia y gravedad creciente, estos no se han traducido de forma similar en progresos terapéuticos.

Se han postulado varios modelos experimentales para la reproducción clínica de un cuadro séptico. Los resultados aquí obtenidos extienden y confirman lo verificado en estudios previos que demostraron que la administración de LPS constituye un modelo estable y reproducible de sepsis ⁽¹⁾. En resumen, estos datos preliminares mostraron que el cuadro séptico 24 hs post LPS se caracterizó por alteraciones hepáticas y pulmonares, disfunción renal, alteraciones hematológicas del medio interno que sugieren hipoxia e hipoperfusión, e hipoglucemia.

Adicionalmente, la dexmedetomidina (DEX) es un sedante indicado para mantener a los pacientes en sedación ligera. En los últimos años, se ha señalado que la DEX podría resultar especialmente beneficiosa en pacientes con sepsis, al poseer efectos antiinflamatorios y disminuir la disfunción diafragmática asociada a la sepsis. Sin embargo, aún resta dilucidar los potenciales efectos beneficiosos del uso de DEX en la sepsis, como así también los mecanismos moleculares subyacentes involucrados en estas acciones no clásicas.

En este sentido, y en concordancia con reportes previos, la administración exógena de DEX mejoró significativamente la función renal durante una endotoxemia y revirtieron notablemente las alteraciones histopatológicas inducidas por LPS ^(10,11).

CONCLUSIÓN

En conclusión, los resultados preliminares obtenidos post administración de DEX indican que esta droga posee efectos protectivos frente la sepsis situándola como un potencial agente terapéutico. Este estudio preliminar provee nuevas perspectivas para nuestras futuras investigaciones tendientes a profundizar los mecanismos protectivos de la DEX frente a un cuadro séptico temprano.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, Star RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest*. 2009.
- Singer, M. et al., Bellomo R, Bernard GR, Chiche J, Craig M, Hotchkiss RS, et al. The Tird Internacional Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA - J Am Med Assoc*. 2016;315(8):801–10.
- M.C. R, G.M. E, R. B, M. B, A. B, B. C, et al. Effect of dexmedetomidine added to standard care on ventilator-free time in patients with agitated delirium a randomized clinical trial. *JAMA*. 2016.
- McGrane S, Thompson JL, Girard TD, Herr DL, Pandharipande PP, Sanders RD, et al. Effect of dexmedetomidine versus lorazepam on outcome in patients with sepsis: an a priori-designed analysis of the MENDS randomized controlled trial. *Crit Care [Internet]*. 2010;14(2):R38. Available from: <http://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/cc8916>
- Romero-Benitez MM, Aguirre MV, Juaristi JA, Alvarez MA, Trifaró JM, Brandan NC. In vivo erythroid recovery following p-clitaxel injury: Correlation between GATA-1, c-MYB, NF-E2, Epo receptor expressions, and apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;
- Li JL, Li G, Jing XZ, Li YF, Ye QY, Jia HH, et al. Assessment of clinical sepsis-associated biomarkers in a septic mouse model. *J Int Med Res*. 2018;46(6):2410–22.
- Zhai X, Yang Z, Zheng G, Yu T, Wang P, Liu X, et al. Lactate as a Potential Biomarker of Sepsis in a Rat Cecal Ligation and Puncture Model. *Mediators Inflamm*. Hindawi; 2018;2018:1–9.
- Qiu R, Yao W, Ji H, Yuan D, Gao X, Sha W, et al. Dexmedetomidine restores septic renal function via promoting inflammation resolution in a rat sepsis model. *Life Sci [Internet]*. Elsevier; 2018;204(February):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.05.001>
- Palizas F. Sepsis - Sociedades Científicas, Autoridades Sanitarias y Comunidad [Sepsis Scientific Societies, Health Authorities and Community]. *Med Intensiva*. 2012;29. Spanish
- Xu L, Bao H, Si Y, Wang X. Effects of dexmedetomidine on early and late cytokines during polymicrobial sepsis in mice. *Inflamm Res*. 2013;62(5):507–14.
- Koca U, Olguner ÇG, Ergür BU, Altekin E, et al. The effects of DEX on secondary acute lung and kidney injuries in the rat model of intra-peritoneal sepsis. *Sci J*. 2013;2013:1–11.