

29. Salud Humana

Evaluación de Potencial

Alternativa Terapéutica frente a un

Cuadro Séptico Temprano

Autor: Ronchi, Julieta; julironchi@hotmail.com;

Co-autor(es): Farizano, Diego; diego.farizano@gmail.com; Huespe, Luis;

dythe_hescuela@hotmail.com; Olea, Gabriela; gbolea@gmail.com; Stoyanoff, Tania

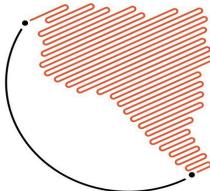
Romina; taniastoyanoff@gmail.com

Departamento de Bioquímica /Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas /Facultad de Medicina

Universidad Nacional del Nordeste

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 morbilidad y si bien avanzó la comprensión de esta problemática, no se ha traducido en progresos terapéuticos. Por lo tanto, alternativas que mitiguen la injuria orgánica resultan ventajosas para reducir la falla multiorgánica. 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 pre-clínico de sepsis inducida por endotoxemia. 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 horas post LPS se determinaron parámetros bioquímicos y del medio interno, así como alteraciones histopatológicas renales, pulmonares y hepáticas (H/E, Tricrómica y PAS). 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: Dexmedetomidina, LPS, 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 (Kent Doi, Asada Leelahanichkul, Peter S.T. Yuen y Robert A. Star, 2009). Dada la complejidad de la patogénesis del cuadro séptico, que involucra cambios hemodinámicos y subsecuente stress hipóxico, activación de la inflamación local, alteraciones microvasculares e injuria celular por apoptosis; se han realizado avances en la comprensión de esta problemática, pero estos no se han traducido de forma similar en progresos terapéuticos (Singer, et al., 2016). 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 benzodiacepinas

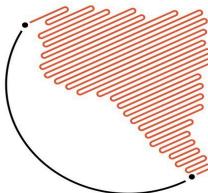
(Reade, et al., 2016). Se ha señalado que la DEX podría resultar especialmente beneficiosa en pacientes con sepsis, al poseer efectos antiinflamatorios y disminuir la disfunción diafragmática asociada a la sepsis, y estudios preliminares sugieren que los pacientes sépticos se beneficiarían más de este tratamiento que los pacientes sin sepsis (McGrane, et al., 2010). 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. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar los efectos de la administración de Dexmedetomidina (DEX) en un modelo pre-clínico de sepsis inducida por endotoxemia. 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 LPS (8 mg/kg) con el potencial efecto beneficioso de la administración de DEX (50 µg/kg) en un protocolo de 24 hs de evolución.

Objetivos

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

Materiales 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 UNNE, mantenidos con dieta estándar y agua ad libitum. Los procedimientos fueron aprobados ante el CICUAL de la Facultad de Medicina-UNNE.

Los ratones fueron divididos al azar en cuatro grupos experimentales. I) Grupo control: Los animales ($n=3$) recibieron una única inyección de solución fisiológica (NaCl 0,9 %) ip. II) Grupo DEX: Los animales ($n=3$) fueron inyectados con DEX (50 μ g/kg) en una dosis por vía intra peritoneal (ip). III) Grupo LPS: Los animales ($n=3$) fueron inyectados con LPS (8 mg / kg) vía ip. IV) Grupo LPS + DEX: Los animales ($n=3$) recibieron 50 μ g/kg de DEX (ip.) en una dosis, media hora antes LPS (8 mg/kg).

A las 24 hs post LPS, se observaron manifestaciones clínicas y los animales fueron anestesiados y eutanizados por dislocación cervical de acuerdo al procedimiento descripto en detalle anteriormente (Aguirre, et al., 2004). Se obtuvieron muestras de sangre periférica por punción cardíaca y órganos (riñon, 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

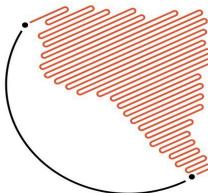
Hematológicos del Medio Interno. Las determinaciones de pH, concentraciones de Lactato, Glucemia y valores de oximetría se realizaron usando el analizador de gases en sangre Radiometer ABL 800 (Radiometer Ibérica SL).

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), PAS y Tricrómica de Masson 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 \pm SD, considerando significativo un $p < 0.05$. Las imágenes digitalizadas fueron procesadas con Adobe Photoshop 8.0.

Resultados y Discusión

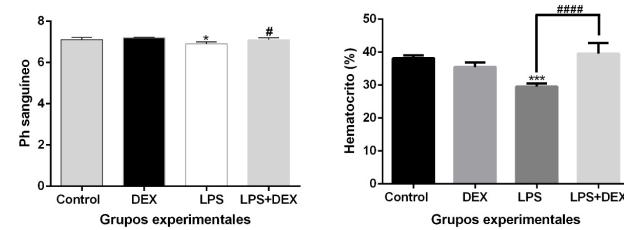
Efecto de la DEX sobre el estado general y parámetros hematológicos del medio interno: Los animales sometidos a endotoxemia exhibieron clásicos signos de sepsis que incluyeron, piloerección, taquipnea, diarrea, exudado periorbital y



letargia desde las primeras horas post inyección de LPS. La 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 (Li, et al., 2018). 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 (Zhai, et al.,

2018). Más aún, su aumento en pacientes es indicativo de peor pronóstico y mortalidad. Sin embargo, en este esquema experimental, los niveles de lactato disminuyeron en las primeras 24 hs, en concordancia con estudios previos en modelos experimentales murinos (Li, et al.,



1.a 2018). Adicionalmente, la

administración de DEX no genera cambios significativos frente al control.

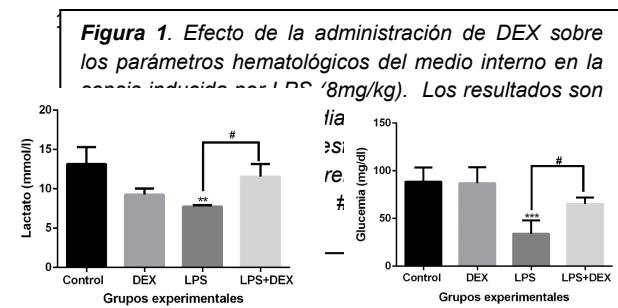
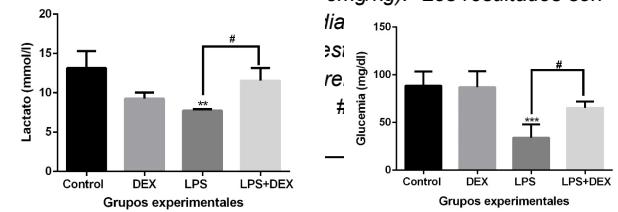


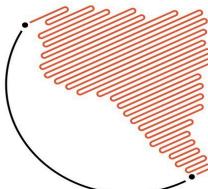
Figura 1. Efecto de la administración de DEX sobre los parámetros hematológicos del medio interno en la sepsis inducida por LPS '8mg/kg). Los resultados son



1.d

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 significativamente la función renal en concordancia con otros estudios en diferente modelo experimental (Qiu et al., 2018).

Grupos experimentales	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)	Urina (ml/h)
Control	~0.4	~1.0	~1.5
DEX	~0.5	~1.0	~1.5
LPS	~0.8	~1.5	~0.5
LPS+DEX	~0.5	~1.0	~1.5

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 ±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

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.

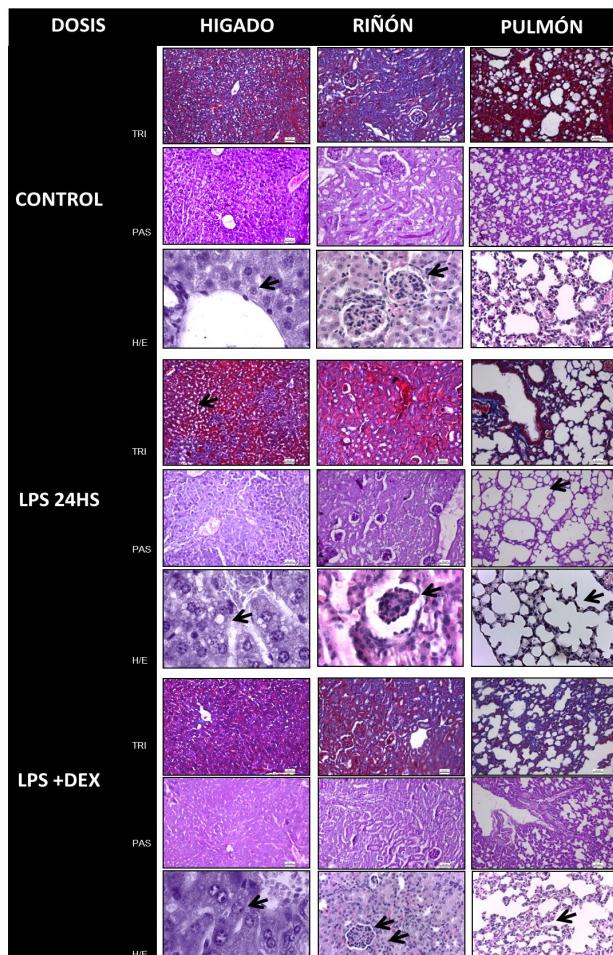
En LPS 24 h se evidenció a) en tejido hepático un incremento de vacuolización celular con infiltrado inflamatorio (flecha); b) en riñón un aumento del espacio del Bowman (flecha) extensa vacuolización, como así también la presencia de núcleos compatibles con muerte celular; y c) en pulmón se observó 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 descriptas tras la administración de DEX en todos los tejidos previamente mencionados. Líneas indican 50μm y 20μm respectivamente.

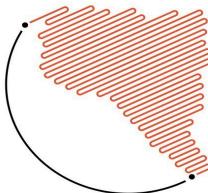
Conclusiones

El grupo LPS+ DEX mostró una mejora significativa tanto en la función renal como de biomarcadores sistémicos de sepsis

La administración de DEX mejoró tanto la extensión como la severidad de los cambios histopatológicos renales, pulmonares y hepáticos en relación al grupo LPS.

En resumen, estos resultados 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, los resultados obtenidos post administración de DEX indican 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.

Referencias Bibliográficas

Aguirre, M. V., Juaristi, J. A., Alvarez, M. A., Romero-Benitez, M. ., Trifaró, J. ., & Brandan, N. C. (2004). *In vivo erythroid recovery following paclitaxel injury: correlation between GATA-1 , c-MYB , NF-E2 , Epo receptor expressions , and apoptosis.* 194, 230–238.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.09.009>

Doi, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S. T., & Star, R. A. (2009). Science in medicine Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *Journal of Clinical Investigation*, 119(10), 2868–2878.
<https://doi.org/10.1172/JCI39421.2868>

Li, J. L., Li, G., Jing, X. Z., Li, Y. F., Ye, Q. Y., Jia, H. H., ... Wang, H. (2018). Assessment of clinical sepsis-associated biomarkers in a septic mouse model. *Journal of International Medical Research*, 46(6), 2410–2422.

<https://doi.org/10.1177/0300060518764717>

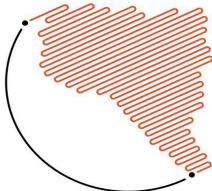
McGrane, S., Thompson, J. L., Girard, T. D., Herr, D. L., Pandharipande, P. P., Sanders, R. D., ... Shintani, A. K. (2010). Effect of dexmedetomidine versus lorazepam on outcome in patients with sepsis: an a priori-designed analysis of the MENDS randomized controlled trial. *Critical Care*, 14(2), R38.
<https://doi.org/10.1186/cc8916>

Qiu, R., Yao, W., Ji, H., Yuan, D., Gao, X., Sha, W., ... Hei, Z. (2018). SC. *Life Sciences*, (2017), #pagerange#. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.05.001>

Reade, M. C., Eastwood, G. M., Bellomo, R., Bailey, M., Bersten, A., Cheung, B., ... Young, P. (2016). Effect of Dexmedetomidine Added to Standard Care. 1–9.
<https://doi.org/10.1001/jama.2016.2707>

Weis, S., Dickmann, P., Pletz, M. W., Coldewey, S. M., Gerlach, H., & Bauer, M. (2017). Eine neue Definition führt zu neuen Konzepten. *Deutsches Arzteblatt International*, 114(29–30), 801–810.
<https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>

Zhai, X., Yang, Z., Zheng, G., Yu, T., Wang, P., Liu, X., ... Tang, W. (2018). *Lactate as a Potential Biomarker of Sepsis in a*



Rat Cecal Ligation and Puncture Model.

2018.

Agradecimientos

A todo el grupo del Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas (Facultad de Medicina-UNNE)

A mi directora: Stoyanoff, Tania Romina y Co-directora: Aguirre, María Victoria

A la Dra. Olea, Gabriela por su importante aporte en técnicas histológicas

Financiamiento

Beca ''Estimulo a las Vocaciones Científicas- Consejo Interuniverstario Nacional'' (EVC-CIN). [Resol. P N° 403/18](#)

Proyecto acreditado por la SGCyT-UNNE PI18I008. ''Efectos anti-inflamatorios y anti-apoptoticos de la dexmedetomidina en un modelo pre-clinico de sepsis''. Director: Stoyanoff, Tania. Co-director: Aguirre, Maria Victoria