



## **AValiação DO EFEITO DO TRATAMENTO DE HSP72 E ANTI-HSP72 EM PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS E FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA EM MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE EM CAMUNDONGOS<sup>1</sup>**

**Samara Cristine Knebel<sup>2</sup>, Maicon Machado Sulzbacher<sup>3</sup>, Lucas Machado Sulzbacher<sup>4</sup>, Thiago Gomes Heck<sup>5</sup>, Matias Nunes Frizzo<sup>6</sup>**

<sup>1</sup> Pesquisa Institucional desenvolvida no Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPef) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ).

<sup>2</sup> Estudante do curso de Biomedicina da UNIJUÍ. Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Tecnológica, financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - PIBITI/CNPq.

<sup>3</sup> Doutorando em Farmacologia pela Universidade Federal de Santa Maria. Integrante do Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPef).

<sup>5</sup> Mestrando do Programa de Pós-Graduação de Atenção Integral à Saúde (PPGAIS), UNIJUÍ/UNICRUZ, integrante do Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPef).

<sup>5</sup> Professor Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS/UNICRUZ/UNIJUÍ). E-mail: thiago.heck@unijui.edu.br

<sup>6</sup> Professor Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS/UNICRUZ/UNIJUÍ). E-mail: matias.frizzo@unijui.edu.br

### **INTRODUÇÃO**

A sepse é uma infecção e inflamação sistêmica que ocasiona disfunção múltipla dos órgãos, ou seja, uma disfunção orgânica com risco de vida causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção. Na avaliação e monitoramento, a sepse é caracterizada por disfunções neurológicas, cardíacas, hepáticas, renais, respiratórias, hematológicas e imunológicas (Seymour et al., 2016).

A manifestação e os agravos na sepse, bem como o pior prognóstico estão relacionados ao aumento do estresse oxidativo além de alterações na HSP70, tanto em sua expressão intracelular (iHSP70) quanto em seus níveis extracelulares (eHSP70). Estudos prévios demonstraram que a intervenção com eHSP72 e anti-HSP70 ao longo da sepse podem modular a resposta celular ao estresse em camundongos, assim como a diminuição da resposta imunológica está associada a agravos na sepse e piores desfechos (Ludwig, 2013; (Sulzbacher; Ludwig; Heck, 2020).

Além disso, parâmetros leucocitários e suas relações possuem elevada sensibilidade para avaliar as respostas imuno inflamatórias, auxiliando tanto para progressão quanto desfecho da doença. Corroborando assim, a disfunção respiratória é relevante na fisiopatologia da sepse, importante biomarcador clínico de gravidade na doença (Lee et al., 2021). A depressão respiratória é caracterizada pela diminuição da frequência respiratória em modelos de sepse em camundongos (Shrum et al., 2014; Sulzbacher et al., 2020, 2022).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar se tratamento com eHSP72 e anti-HSP72 modifica frequência respiratória e parâmetros leucocitários em modelo experimental de sepse em camundongos.

## **METODOLOGIA**

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram divididos em quatro grupos experimentais: animais que não receberam nenhuma intervenção, Controle (CONT, n= 6), submetidos a sepse (SEP, n= 6), animais com sepse que receberam a intervenção com eHSP72 (SEP+eHSP72, n= 6) e animais com sepse que receberam anticorpo anti-HSP72 (SEP+anti-HSP72, n= 6). Os animais foram avaliados nos tempos 0, 4, 12 e 24 horas após a indução da sepse, em questão de frequência respiratória e parâmetros hematológicos, foram mantidos em gaiolas, em ambiente com temperatura controlada ( $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com ciclos de claro/escuro de 12 horas, ração padronizada para animais de laboratório (Nuvilab CR-1) em comedouros localizados nas tampas das gaiolas e água potável *ad libidum*. (CEUA-UNIJUÍ protocolo 008/2021).

Os animais receberam solução fecal 20% autógena (200mg/mL, i.p.) na dose de 1 mg/g. (SHRUM et al., 2014, SULZBACHER et al., 2018). No tempo de 12 horas de indução de sepse foram utilizados os tratamentos experimentais. A eHSP72 (HSPA1A; Enzo, ADI-ESP-502), foi administrada (i.v.) na dose de 1,33 ng/g (Sulzbacher et al., 2020), nos animais SEP+eHSP72. os animais do grupo SEP+anti-HSP72 receberam a administração (i.v.) de anticorpo anti-HSP72 (H5147; Sigma Aldrich) na dose de 1,33 ng/g.

Para a avaliação da frequência respiratória os animais foram posicionados individualmente dentro de um frasco transparente, forrado com maravalha, sendo filmados por 5 minutos consecutivos com câmera digital. As imagens foram assistidas desaceleradas por um avaliador cegado, que realizou a contagem dos movimentos torácicos durante um minuto. (Sulzbacher et al., 2020).

Para a coleta de sangue, seguiu-se a ordem cronológica da metodologia, nos tempos 0, 04, 12 e 24 horas, coletas por punção caudal para a realização do hemograma e demais análises laboratoriais. Após 24 horas da indução da sepse, os animais foram eutanasiados com posterior coleta de sangue, sendo o mesmo coletado do tronco dos animais com EDTA (Neves et al., 1997). As amostras de sangue anticoaguladas ( $5\mu\text{L}$  de EDTA, para cada  $500\mu\text{L}$

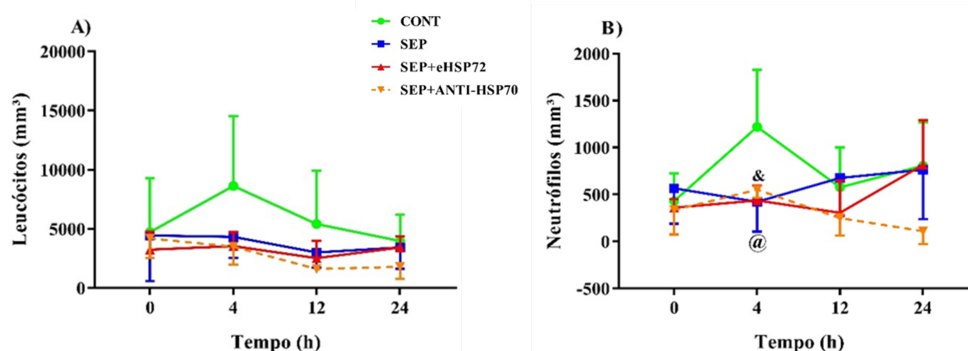
de sangue) foram avaliadas no analisador hematológico Micros 60 (Horiba) com posterior avaliação hematoscópica (Bedell; Bush, 1985). Para o cálculo da relação celular utilizou-se a razão entre as contagens absolutas de cada célula.

Para análise dos parâmetros leucocitários realizou-se teste de ANOVA de duas vias seguido de teste de Tukey e para a frequência respiratória teste de ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como ilustrado na figura 1A, não se evidencia diferença entre os grupos, na leucometria ao longo das 24 horas, ou seja, os grupos controle, sepse+anti-HSP72 e sepse+eHSP72, apresentaram respostas imunológicas semelhantes, resultando em contagens totais de leucócitos similares. Na figura 1B, identificamos que no tempo de quatro horas já houve uma redução na contagem absoluta de neutrófilos dos grupos sepse, sepse+eHSP72 e sepse+anti-HSP72 em relação ao grupo controle. Após o tempo 4 horas e após as intervenções (tempo 12 horas), o grupo sepse+anti-HSP72 acentuou a diminuição de neutrófilos em relação aos demais grupos experimentais. A contagem de neutrófilos no sangue sofre alterações conforme a progressão da doença inflamatória, sendo liberados na corrente sanguínea com função de combater infecções e inflamações (Huang et al., 2020) como por exemplo, a sepse. No grupo sepse tratado com eHSP72, essa diminuição nos níveis de neutrófilos pode indicar que o tratamento com eHSP72 teve um efeito modulador na resposta imunológica durante as primeiras 12 horas após a indução.

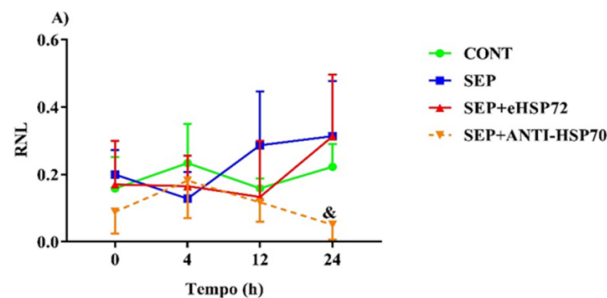
**Figura 1:** Análise hematológica a partir da determinação da contagem de leucócitos totais (A) e contagem diferencial de neutrófilos (B) após 24 horas da indução da sepse, pela metodologia de injeção intraperitoneal de solução fecal 20% (1 mg/g). Análise estatística realizada a partir de teste de ANOVA de duas vias seguido de teste de Tukey ( $P < 0,05$ ; @ CONT vs. SEP, & CONT vs. SEP+eHSP72). CONT = Controle (n=5); SEP = Sepse (n=6); SEP+HSP72 = Sepse tratado com eHSP72 (n=5); SEP+ANTI-HSP70 = Sepse tratado com anticorpo para HSP70 (n=3). Fonte: próprios autores.



Fonte: próprios autores.

Já na análise da relação neutrófilo - linfócito (RNL), figura 2A, no tempo de 24 horas após a indução da sepse, identificamos diminuição significativa, ( $P < 0,05$ ), entre sepse+anti-HSP72 e grupo sepse+eHSP72. Cabe destacar que os neutrófilos desempenham um papel fundamental na resposta imunológica inata da sepse e os linfócitos na resposta imunológica adaptativa específica, sendo sua relação um biomarcador sensível de infecção e inflamação (Zahorec, 2021). Além disso, a diminuição da RNL no grupo sepse+anti-HSP72, sugere que a intervenção com esse anticorpo pode ter modulado negativamente a resposta imunológica.

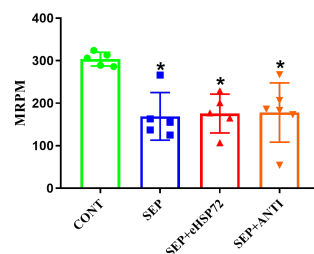
**Figura 2:** Análise da relação neutrófilo linfócito (RNL) (A) em 24 horas após a indução da sepse a partir de injeção intraperitoneal de solução fecal 20% (1 mg/g). Análise estatística realizada a partir de teste de ANOVA de duas vias seguido de teste de Tukey ( $P < 0,05$ ; & SEP+Anti-HSP72 vs. SEP+eHSP72. CONT = Controle (n=6); SEP = Sepse (n=6); SEP+HSP72 = Sepse tratado com eHSP72 (n=5); SEP+ANTI-HSP72 = Sepse tratado com anticorpo para HSP72 (n=3).



Fonte: próprios autores.

A figura 3 analisa a frequência respiratória 24 horas após a indução da sepse, sendo que identificamos uma diminuição da frequência respiratória nos grupos sepse, SEP+eHSP72 e SEP+anti-HSP72 comparadas ao grupo controle, demonstrando a piora clínica dos animais sépticos. As elevações nas concentrações de eHSP72 foram previamente correlacionadas com a diminuição da mortalidade em um modelo experimental de sepse (Tsai et al., 2015; Sulzbacher et al., 2020). No entanto, neste experimento não foi possível observarmos diferenças na frequência respiratória entre os grupos sepse, SEP+eHSP72 e SEP+anti-HSP72.

**Figura 3:** A análise da frequência respiratória (movimentos respiratórios por minuto, MRPM) 24 horas estatística dos parâmetros ao longo do período experimental foi realizada a partir de ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey,  $*P < 0,05$ , vs. CONT. CONT = Controle (n=6); SEP = Sepse (n=6); SEP+HSP72 = Sepse tratado com eHSP72 (n=6); SEP+ANTI-HSP72 = Sepse tratado com anticorpo para HSP72 (n=6).



Fonte: próprios autores.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Demonstramos que a HSP72 desempenha um papel imunomodulador na sepse, principalmente pela análise do biomarcador RNL. Em relação a frequência respiratória observamos que tanto o tratamento com eHSP72, quanto com anti-HSP72 não foram capazes de reverter os efeitos na frequência respiratória decorrente da sepse nos animais.

**Palavras-chave:** Septicemia. Camundongo. Leucometria. Frequência Respiratória.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica, especialmente ao PIBITI/CNPQ pela concessão de bolsas, incentivando a pesquisa e ao Grupo de Pesquisa em Fisiologia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bedell, Susanna E.; Bush, Booker T. Erythrocyte sedimentation rate. From folklore to facts. *The American Journal of Medicine*, v. 78, n. 6, p. 1001-1009, 1985. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0002934385902244>. Acesso em: 13 mar. 2023
- Shrum, Bradly et al. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. *BMC research notes*, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2014.
- Huang, Zhiwei et al. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in sepsis: A meta-analysis. *The American journal of emergency medicine*, v. 38, n. 3, p. 641-647, 2020.
- Lee, C. U. et al. The index of oxygenation to respiratory rate as a prognostic factor for mortality in Sepsis. *The American Journal of Emergency Medicine*, v. 45, p. 426-432, 1 jul. 2021.
- Ludwig, Mirna Stela. Proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70) ligam-se à insulina na circulação sanguínea modulando a disponibilidade de glicose circulante. 2013.
- Seymour, C. W. et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*, v. 315, n. 8, p. 762-774, 2016.
- Sulzbacher, Maicon Machado; Ludwig, Mirna Stela; Heck, Thiago Gomes. Estresse oxidativo e diminuição de HSP70 tecidual envolvidos na gênese da sepse: HSP70 como alvo terapêutico. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 32, p. 585-591, 2020.
- Sulzbacher, M. M. et al. Adapted Murine Sepsis Score : Improving the Research in Experimental Sepsis Mouse Model. *BioMed Research International*, v. 2022, 2022a
- Tsai, Tsen-Ni et al. Release of endogenous heat shock protein 72 on the survival of sepsis in rats. *journal of surgical research*, v. 198, n. 1, p. 165-174, 2015.
- Zahorec, R. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, past, present and future perspectives. *Bratisl Lek Listy*, v. 122, n. 7, p. 474-488, 2021.