



AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO, EM MODELO EXPERIMENTAL, DE SEPSE¹

Amanda Victoria Mattes², Samara Cristine Knebel³, Lucas Machado Sulzbacher⁴, Maicon Machado Sulzbacher⁵, Thiago Gomes Heck⁶; Matias Nunes Frizzo⁷

¹ Pesquisa desenvolvida na Unijuí; financiado pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Tecnológica e Inovação da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - PIBITI/UNIJUÍ.

² Bolsista UNIJUÍ; Estudante do curso Biomedicina da UNIJUÍ.

³ Mestranda em Atenção Integral à Saúde - PPGAIS. Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF-UNIJUÍ.

⁴ Mestre em Atenção Integral à Saúde - PPGAIS. Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF-UNIJUÍ.

⁵ Mestre em Atenção Integral à Saúde - PPGAIS. Professor do curso de Biomedicina. Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF-UNIJUÍ.

⁶ Professor do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde - PPGAIS. Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF-UNIJUÍ.

⁷ Professor do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde - PPGAIS. Professor do curso de Biomedicina. Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF-UNIJUÍ. E-mail: matias.frizzo@unijui.edu.br

INTRODUÇÃO

A sepse é uma condição grave caracterizada por infecção e inflamação sistêmica que causa disfunção múltipla de órgãos, incluindo os sistemas nervoso, cardíaco, hepático, renal, respiratório, hematológico e imunológico (SEYMOUR et al., 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a sepse afeta cerca de 49 milhões de pessoas anualmente, resultando em aproximadamente 11 milhões de mortes. É uma das principais causas de mortalidade e doença crítica, e a principal causa de morte nas UTIs de países desenvolvidos (DOERRIER et al., 2014).

A sepse está relacionada ao aumento do estresse oxidativo em diversos órgãos, incluindo o fígado (BOUGLÉ et al., 2018). Esse estresse decorre do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade do organismo de neutralizá-las com antioxidantes. Durante a sepse, a resposta imunológica exacerbada gera grandes quantidades de EROs, que, apesar de serem cruciais para eliminar patógenos, podem danificar células e tecidos (RITTER, 2003). Antioxidantes como a glutathione ajudam a neutralizar as EROs e a manter a homeostase celular (KUMAR et al., 2018).

No fígado, o estresse oxidativo pode causar lesões e piorar a disfunção hepática na sepse. Assim, avaliar o estado redox hepático durante a sepse é crucial, pois o fígado desempenha um papel central em processos metabólicos essenciais (ALLAMEH et al., 2024). Este estudo visa avaliar o estresse oxidativo no fígado de camundongos com sepse, analisando a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT),



lipoperoxidação e dosagem de tióis não proteicos (glutaciona). Dentro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) o resumo se encontra dentro do objetivo 3.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo experimental, em modelo animal de sepse em camundongos, aprovado pela CEUA-UNIJUÍ protocolo 008/2021. Foram utilizados 12 camundongos da linhagem C57BL/6 com cerca de 90-150 dias, provenientes do Biotério da UNIJUÍ, sendo mantidos com temperatura controlada ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclos de claro/escuro de 12 horas, ração padronizada e água ad libitum. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: Grupo Controle: (n=6), recebeu injeção de solução fisiológica (NaCl 0,9% estéril); e Grupo Sepse: (n=6), recebeu injeção intraperitoneal de solução fecal 20% (1mg/g) para indução da sepse. Após 24 horas da indução da sepse, os animais foram eutanasiados com posterior coleta de tecidos.

Após a eutanasia os animais foram pesados, sendo em seguida realizada a coleta e pesagem do fígado de cada animal. Após a pesagem em balança analítica, foi realizado o peso relativo pelo peso do fígado (g) pelo peso corporal do animal (kg). Após foi realizada a coleta do fígado, qual foi homogeneizado em Tampão Fosfato de Sódio com PMSF, para análises enzimáticas (SOD e CAT), lipoperoxidação e atividades de tióis não proteicos (NPSH). Durante a coleta do fígado, os órgãos foram fotografados, utilizando-se câmera fotográfica e suporte padronizados. O peso dos animais foi mensurado em balança semi-analítica ao final do experimento.

A determinação da lipoperoxidação (LPO) foi realizada pelo teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) através método espectrofotométricos em comprimento de onda de 595 e a 535nm, utilizando curva padrão de albumina (BRADFORD, 1976) e curva padrão de malonaldeído (MDA) (BUEGE; AUST, 1978). A atividade da SOD foi avaliada por espectrofotometria a 420nm, através da reação da inibição da auto-oxidação do pirogalol pela atividade da enzima SOD. A atividade da CAT foi determinada através da decomposição do peróxido de hidrogênio a 25°C , em 240nm de absorbância (ALMEIDA, 2015). Os tióis não proteicos foram mensurados pelo método de espectrofotométrico a 405nm (ANSCHAU, 2011).



Após a tabulação dos dados coletados, os mesmos foram analisados no programa de análise estatística (GraphPad). Em seguida foram elaborados gráficos, análise de medidas de tendência central e dispersão para a comparação entre grupos experimentais. Os dados foram analisados quanto à normalidade com o teste de Shapiro-Wilk, além da realização de teste de ROUT (5%) para detectar valores discrepantes (outliers). Foi realizado o Teste T Student, sendo considerado o nível de significância de 5% ($P < 0,05$), para as análises realizadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nossos resultados, identificamos um aumento de peso do fígado do grupo sepse (figura 1), assim como acrescentamos as imagens registradas do fígado de cada animal, onde a coloração do fígado dos animais do grupo sepse estavam com hipocoloração e características de palidez tecidual, comparadas aos fígados dos animais do grupo controle (figura 1).

As alterações de peso e coloração decorrem, pois na sepse ocorre infiltração de células inflamatórias no tecido hepático, assim como o aumento de citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda, as quais podem levar a um aumento no tamanho e peso do órgão. Além disso, pode ocorrer uma desorganização estrutural e funcional do fígado, resultando em alterações na aparência macroscópica, conforme ilustrado na figura 1. A coloração pálida observada no fígado dos animais com sepse está associada à redução na perfusão sanguínea. Durante a sepse, a inflamação sistêmica provoca vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, resultando em hipoperfusão hepática e hipóxia tecidual. Esses processos comprometem a oxigenação e o fornecimento de nutrientes ao fígado, contribuindo para a hipocoloração observada. Além disso, na sepse há disfunção mitocondrial, alterações metabólicas, um aumento de mediadores inflamatórios e morte celular programada (apoptose) ou necrose dos hepatócitos, os quais comprometem as funções do órgão. Este conjunto de fatores está associado com alterações no fígado como o aumento do peso e nas alterações macroscópicas da aparência do órgão (ALLAMEH et al., 2024).

Figura 1 - Peso Relativo do Fígado e Fígado do Grupo Controle (CONT) e Grupo Sepse (SEP)



inflamatórios hepáticos, afetando a produção de energia e a regulação do estado redox e o funcionamento do órgão. Ademais, a resposta inflamatória intensa na sepse pode causar aumento do tamanho, peso e aspecto do órgão, as quais associam-se com a alteração do estado redox e nas funções orgânicas do fígado (LIMA et al., 2011).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados na análise do fígado demonstram um aumento no peso relativo, o qual estava associado ao quadro inflamatório da sepse, assim como um maior consumo de glutatona para compensar o aumento da geração de EROs na sepse.

Palavras-chave: Sepse, Estresse Oxidativo, Fígado.

Agradecimentos: CNPq, FAPERGS, CAPES, PPGAIS-UNIJUÍ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, Rômulo Rodrigo de Souza. **Alterações hepáticas na expressão gênica e atividade da catalase e superóxido dimutase em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina**. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- ALLAMEH, Abdolamir. et al. Oxidative Stress in Liver Pathophysiology and Disease. **Antioxidants**, v. 12, n. 9, p. 1653, 2023.
- ANSCHAU, Valesca et al. **Estresse oxidativo e parâmetros hematológicos como biomarcadores da infecção experimental com Trypanosoma evansi em ratos**. 2011.
- BOUGLÉ, A. et al. Micro-fragmented fat injection reduces sepsis-induced acute inflammatory response in a mouse model. **British Journal of Anaesthesia**, v. 121, n. 6, p. 1249?1259, 2018.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248?54, 7 maio 1976.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 52, p. 302?10, jan. 1978.
- CONSTANTINO, L. et al. **Regulation of lung oxidative damage by endogenous superoxide dismutase in sepsis**. **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 2, n. 1, p. 17, 2014.
- DE LEON, Jesús Aguilar Diaz; BORGES, Chad R. Evaluation of oxidative stress in biological samples using the thiobarbituric acid reactive substances assay. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 159, p. e61122, 2020.
- DOERRIER, C. et al. Identification of mitochondrial deficits and melatonin targets in liver of septic mice by high-resolution respirometry. **Life Sciences**, v. 15, p. 121?158, 2014.