



Evento: XV Seminário de Inovação e Tecnologia

## **TRATAMENTO COM eHSP72 EM MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE E SEUS EFEITOS SOBRE O ESTADO REDOX<sup>1</sup>**

**Sarah Gabriela Scholten de Oliveira<sup>2</sup>; Eduarda Bordignon<sup>3</sup>; Lucas Machado Sulzbacher<sup>4</sup>; Maicon Machado Sulzbacher<sup>5</sup>; Matias Nunes Frizzo<sup>6</sup>**

<sup>1</sup> Projeto de pesquisa desenvolvido na Unijuí

<sup>2</sup> Bolsista; estudante do curso Biomedicina; Bolsista do programa de fomento: Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Tecnológica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - PIBITI/CNPq (GPeF).

<sup>3</sup> Bolsista; estudante do curso Biomedicina; Bolsista do programa de fomento: Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Tecnológica da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - PIBITI/UNIJUÍ (GPeF).

<sup>4</sup> Professor UNIJUÍ pesquisador do projeto Efeito Farmacogenômico do Desbalanço de Superóxido no Tratamento da Sepses Com HSPs(GPeF).

<sup>5</sup> Professor UNIJUÍ pesquisador do projeto Efeito Farmacogenômico do Desbalanço de Superóxido no Tratamento da Sepses Com HSPs (GPeF).

<sup>6</sup> Professor PPGAIS (UNIJUÍ) orientador do projeto Efeito Farmacogenômico do Desbalanço de Superóxido no Tratamento da Sepses Com HSPs (GPeF).

### **INTRODUÇÃO**

A sepsis é uma síndrome complexa e grave, definida como uma disfunção orgânica com risco de morte, resultante de uma resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção (SEYMOUR *et al.*, 2016). Globalmente, gera cerca de 49 milhões de casos e 11 milhões de óbitos anuais (WHO, 2024), com incidência e letalidade da sepsis crescentes em idosos devido à imunossenescência e comorbidades (IBARZ *et al.*, 2024).

A sepsis promove o estresse oxidativo, caracterizado pela produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs), superando a capacidade antioxidante do organismo e promovendo lesões celulares generalizadas e disfunção de múltiplos órgãos, como coração, pulmões e rins. No coração, a exposição a lipopolissacarídeo (LPS) induz estresse oxidativo, expressão de caspases e apoptose de cardiomiócitos, agravando a inflamação e aumentando a síntese de óxido nítrico (NO), que compromete a perfusão tecidual. No pulmão, a sepsis pode desencadear a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), resultando em hipóxia e falência respiratória (HUANG *et al.*, 2019). Já nos rins, a lesão renal aguda associada à sepsis (LRA-S) envolve inflamação, disfunção microcirculatória, hipóxia e estresse oxidativo, associada com disfunção mitocondrial e acúmulo de malondialdeído (MDA) (AGUILAR *et al.*, 2024). Diante disso, o organismo ativa enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), que atuam sequencialmente na neutralização das EROs. A razão



entre suas atividades (SOD/CAT) é um índice sensível do estado redox tecidual, e seu aumento pode indicar acúmulo de  $H_2O_2$  e potencial dano oxidativo (FERREIRA *et al.*, 2020).

As proteínas de choque térmico (HSPs) são chaperonas moleculares vitais na homeostase proteica e na resposta ao estresse celular. A isoforma intracelular HSP70 (iHSP70), incluindo HSP72 e HSP73 (HSC70), protege contra danos celulares. A HSP72 extracelular (eHSP72), embora reconhecida como marcador de estresse e ativador pró-inflamatório, tem seu potencial imunomodulador explorado experimentalmente, com estudos indicando efeitos benéficos como redução do estresse oxidativo e melhora da função pulmonar em modelos murinos de sepse em animais adultos tratados com a administração endovenosa de eHSP72 (1.33 ng/g) (SULZBACHER *et al.*, 2020).

Considerando a maior vulnerabilidade de indivíduos mais velhos à sepse, impulsionada por fatores como imunossenescência e inflamação crônica de baixo grau (IBARZ *et al.*, 2024), é fundamental investigar intervenções terapêuticas com novos princípios ativos voltadas a esse grupo. Modelos experimentais murinos envelhecidos (camundongos com idade entre 7 e 12 meses) representam uma ferramenta relevante, permitindo a simulação de aspectos imunológicos e fisiológicos do envelhecimento (IBARZ *et al.*, 2024). Nesse contexto, este estudo investigou os efeitos do tratamento com eHSP72 sobre parâmetros de estresse oxidativo (atividade de SOD e CAT em pulmão e coração, e lipoperoxidação em pulmão, coração e rim) em camundongos envelhecidos submetidos à sepse. Este trabalho está alinhado à Meta 3.9 dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS).

## **METODOLOGIA**

Trata-se de um estudo experimental em modelo animal de sepse. Foram utilizados 18 camundongos C57BL/6 envelhecidos (aproximadamente 210 dias), provenientes do Biotério da UNIJUÍ, mantidos em condições controladas, tendo o protocolo experimental aprovado pela CEUA-UNIJUÍ (parecer CEUA nº 008/2021).

Os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos (n=6 por grupo): Controle (CONT), Sepse (SEP) e Sepse+eHSP72 (SEP+eHSP72). A sepse foi induzida por injeção intraperitoneal de solução fecal a 20% (1 mg/g), mimetizando uma peritonite grave (SULZBACHER *et al.*, 2018). O grupo CONT recebeu solução fisiológica (NaCl 0,9%). Doze horas após a indução da sepse, o grupo SEP+eHSP72 recebeu tratamento endovenoso



com HSP72 recombinante (Enzo, ADI-ESP-502) na dose de 1,33 ng/g, visando mimetizar concentrações elevadas de eHSP72 em fases tardias da sepse (SULZBACHER *et al.*, 2020).

Após 24 horas da indução da sepse, os animais foram eutanasiados e os tecidos coletados. Para as análises de estresse oxidativo, os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (KPi - pH 7,4) com inibidor de protease. A atividade da SOD foi determinada por espectrofotometria a 420 nm (MARKLUND; MARKLUND, 1974) e a atividade da CAT a 240 nm (AEBI, 1984). Os níveis de lipoperoxidação foram avaliados pelo teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) a 535 nm, com resultados expressos em nmol de malonaldeído (MDA) por mg de proteína (BUEGE; AUST, 1978). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Os dados foram avaliados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e presença de outliers (teste de ROUT, Q = 5%). As comparações entre grupos foram realizadas por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão, sendo considerado estatisticamente significativo  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

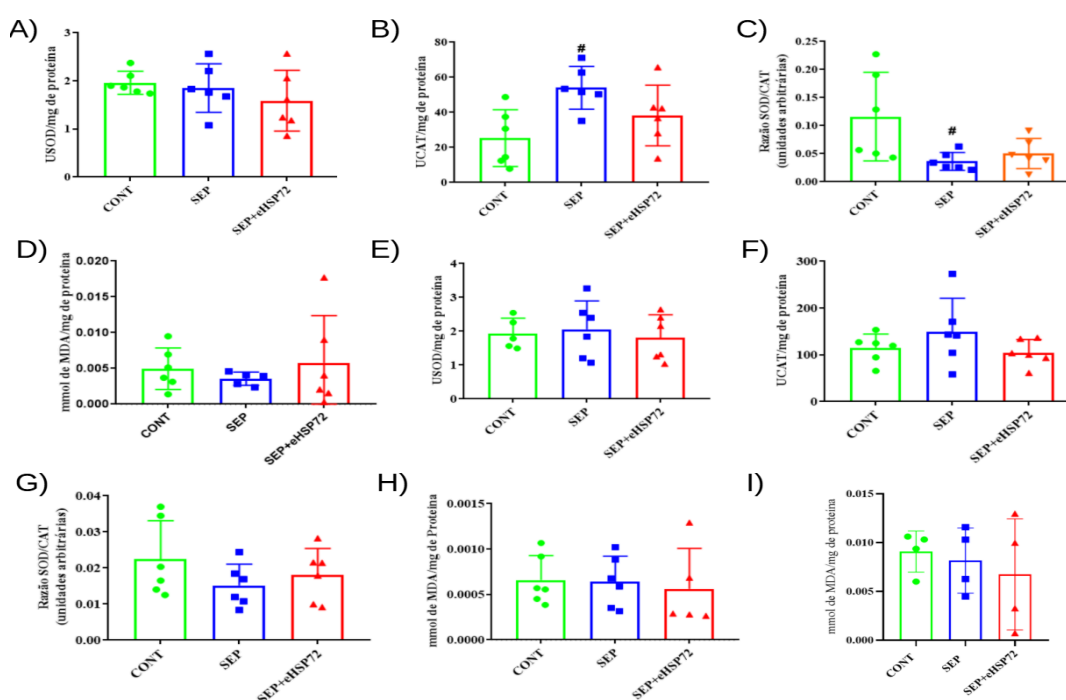
Em amostras pulmonares, a atividade da SOD não apresentou diferenças significativas entre os grupos (Figura 1A). Esse resultado pode ser atribuído ao envelhecimento dos animais (210 dias), que naturalmente reduz a atividade da SOD nos tecidos pulmonar e cardíaco, limitando a resposta antioxidante mesmo em quadros infecciosos (MARGOTTI *et al.*, 2022). Essa condição pré-existente de menor atividade da SOD pode ter impedido uma resposta mais robusta frente ao estresse oxidativo (SULZBACHER *et al.*, 2020).

No entanto, observou-se um aumento na atividade da CAT no grupo sepse em relação ao controle, resposta que foi parcialmente atenuada pela administração de eHSP72 (Figura 1B). Esse aumento da CAT pode ser uma resposta adaptativa ao acúmulo de peróxido de hidrogênio gerado pela infecção, e sua atenuação no grupo tratado sugere um possível efeito modulador da eHSP72. A não normalização completa da atividade da CAT pode refletir a gravidade do quadro séptico e a limitação da intervenção terapêutica nesse modelo (CICEK *et al.*, 2021; MARGOTTI *et al.*, 2022). Consequentemente, a razão SOD/CAT se apresentou diminuída no grupo sepse, indicando um potencial acúmulo de peróxido de hidrogênio que pode contribuir para dano oxidativo tecidual, tendo sido parcialmente restaurada pelo tratamento com eHSP72 (Figura 1C).



No tecido cardíaco, não foram observadas alterações significativas na atividade das enzimas SOD (Figura 1E) e CAT (Figura 1F), nem na razão SOD/CAT (Figura 1G) entre os grupos. A ausência de alterações mensuráveis no coração pode estar relacionada à idade dos animais, que pode impactar a capacidade antioxidante cardíaca em responder a desafios infecciosos (VOLT *et al.*, 2016).

**Figura 1** - Resultados dos parâmetros de estresse oxidativo em pulmão, coração e rim de camundongos com sepse e tratados com eHSP72.



**Legenda:** Efeito da administração de eHSP72 na sepse na atividade da enzima SOD pulmonar (A;  $P=0,41$ ), na atividade da CAT pulmonar (B;  $\#P=0,0145$ ), na razão SOD/CAT pulmonar (C;  $\#P=0,033$ ), e na concentração de TBARS (lipoperoxidação) pulmonar (D;  $P=0,70$ ). Efeito da administração de eHSP72 na sepse na atividade da SOD cardíaca (E;  $P=0,82$ ), na atividade da CAT cardíaca (F;  $P=0,28$ ), na razão SOD/CAT cardíaca (G;  $P=0,32$ ), e na concentração de TBARS cardíaca (H;  $P=0,59$ ). Efeito da administração de eHSP72 na sepse na concentração de TBARS renal (I;  $P=0,71$ ). Grupos: controle (CONT), sepse (SEP) e sepse com administração endovenosa de eHSP72 (SEP+eHSP72).

Os resultados de lipoperoxidação nos três tecidos (Figuras 1D, 1H e 1I) sugerem que o período de 24 horas após a indução da sepse pode não ter sido suficiente para a mensuração de um acúmulo detectável de malondialdeído (MDA), indicando uma cinética diferente para a detecção desses marcadores de dano oxidativo (COSTA *et al.*, 2019). Embora os animais com sepse apresentem um quadro de infecção sistêmica estabelecido (SULZBACHER *et al.*, 2022) e aumento na produção de EROs (POGGI; DANI, 2018), a ausência de alterações significativas na atividade da SOD pulmonar e cardíaca pode ser explicada pela redução





natural da atividade dessa enzima em tecidos de animais envelhecidos (MARGOTTI *et al.*, 2022).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sepse induzida em camundongos envelhecidos promoveu alterações específicas no estresse oxidativo pulmonar, com aumento da atividade da CAT e consequente redução da razão SOD/CAT, refletindo um desequilíbrio no sistema antioxidante local. A administração de eHSP72 atenuou parcialmente essas alterações, sugerindo um potencial de efeito modulador.

**Palavras-chave:** Sepse. eHSP72. Estresse oxidativo.

## AGRADECIMENTOS

CNPq; CAPES; UNIJIÚ.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, M. et al. Sepsis-Associated Acute Kidney Injury: Pathophysiology and Treatment Modalities. **The Cureus Journal of Medical Science**. 2024. DOI 10.7759/cureus.75992.
- 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. 248-254, 7 maio 1976.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 52, p. 302-310, jan. 1978.
- CICEK, M. et al. Investigation of oxidant/antioxidant and anti-inflammatory effects of apigenin on apoptosis in sepsis-induced rat lung. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 35, n. 5, p. 1-11, 2021.
- HUANG, M. *et al.* The Pathogenesis of Sepsis and Potential Therapeutic Targets. **International Journal of Molecular Sciences**. 2019, 20, 5376; DOI:10.3390/ijms20215376
- IBARZ, M et al. The critically ill older patient with sepsis: a narrative review. **Ann Intensive Care**. 2024;14:6. DOI: 10.1186/s13613-023-01233-7
- MARGOTTI, W. et al. Oxidative stress in multiple organs after sepsis in elderly rats. **Experimental Gerontology**, v. 160, n. August 2021, p. 111705, 2022.
- MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 16 set. 1974.
- POGGI, C.; DANI, C. Sepsis and Oxidative Stress in the Newborn: From Pathogenesis to Novel Therapeutic Targets. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1-14, 2018.
- 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, M. M. et al. A single dose of eHSP72 attenuates sepsis severity in mice. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 9198, 8 dez. 2020.
- SULZBACHER, M. M. et al. Adapted Murine Sepsis Score: Improving the Research in Experimental Sepsis Mouse Model. **BioMed Research International**, v. 2022, p. 1-9, 27 jan. 2022.
- VOLT, H. et al. Same molecule but different expression: Aging and sepsis trigger NLRP3 inflammasome activation, a target of melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 60, n. 2, p. 193-205, 2016.
- WHO. **Sepsis**. 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis>