

Evento: XXVII Seminário de Iniciação Científica - BOLSISTAS DE GRADUAÇÃO UNIJUI

**ANÁLISE DA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO DE 70KDA (HSP70) E DO
ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE¹
ANALYSIS OF 70 KDA HEAT SHOCK PROTEIN AND OXIDATIVE STRESS
IN EXPERIMENTAL MODEL OF SEPSIS**

**Larissa Meotti Müller², Lucas Machado Sulzbacher³, Wellington Felipe
Althaus⁴, Maicon Machado Sulzbacher⁵, Mirna Stela Ludwig⁶, Thiago
Gomes Heck⁷**

¹ Trabalho de pesquisa realizado pelo Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF, Departamento de Ciências da Vida - DCVida, UNIJUI.

² Acadêmica do Curso de Fisioterapia - UNIJUI, Bolsista PIBIC/UNIJUI, Grupo de Pesquisa em Fisiologia/GPeF

³ Acadêmico do Curso de Enfermagem - UNIJUI, Bolsista PROBIC/FAPERGS, Grupo de Pesquisa em Fisiologia/GPeF.

⁴ Acadêmico do curso de Farmácia - UNIJUI, Bolsista PIBIC/CNPq, Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF.

⁵ Enfermeiro graduado na Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - UNIJUI. Mestre em Atenção Integral a Saúde (UNICRUZ - UNIJUI). Integrante do Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI (GPeF).

⁶ Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS)- UNIJUI/UNICRUZ, professora do Departamento de Ciências da Vida-UNIJUI.

⁷ Orientador. Docente do Departamento de Ciências da Vida - UNIJUI - Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde UNICRUZ/UNIJUI

INTRODUÇÃO

A sepse é uma inflamação sistêmica que ocorre devido à infecção, marcada por disfunção de múltiplos órgãos. Na sepse ocorre lesão e disfunção pulmonar, ocasionando prejuízo respiratório (WANG Y, 2018). Ademais, o fígado sofre prejuízo funcional, com consequente acúmulo de lipídeos, caracterizando a esteatose no tecido (CHUNG et al., 2017), que pode ser observada a nível macroscópico pela modificação de coloração do mesmo (KORISH; ARAFAH, 2013).

Na sepse é comum a instalação de um quadro de estresse oxidativo. Quando existe um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e as defesas antioxidantes, como a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), é ocasionado um potencial estresse oxidativo que por sua vez pode desencadear a lipoperoxidação, formando produtos secundários como o malondialdeído (MDA). Esta lipoperoxidação é um mecanismo de lesão celular no tecido pulmonar (YUAN ET AL., 2019), acarretando depressão respiratória (LI et al., 2018). O estresse oxidativo também se manifesta pelo aumento da lipoperoxidação hepática (DALIA M ET AL; 2015). Um mecanismo natural de defesa celular presente em todos os organismos vivos, denominado de resposta ao estresse ou resposta ao choque térmico, é caracterizado pela expressão da proteínas de choque térmico (do inglês Heat Shock Protein) de 70 kDa (HSP70) (KANG et al., 2016;

Evento: XXVII Seminário de Iniciação Científica - BOLSISTAS DE GRADUAÇÃO UNIJUI

FONSECA; RIBEIRO, 1999). A HSP70 quando encontrada no ambiente intracelular (iHSP70) tem demonstrado proteger as células contra o dano oxidativo das ERO, sugerindo capacidade antioxidante da HSP70 (ATALAY et al., 2004). Portanto esse estudo teve como objetivo verificar a expressão de iHSP70, lipoperoxidação e atividade antioxidante nos tecidos hepático e pulmonar, além de verificar aspecto macroscópico do fígado 24 horas após a indução da sepse.

METODOLOGIA

Foram utilizados 15 camundongos (C57BL/6, 90 a 150 dias), provenientes do Biotério do DCVida da UNIJUI, mantidos sob condições adequadas, divididos em dois grupos: Controle (n = 7), Sepse (n = 8). Os animais submetidos a sepse receberam solução fecal via intraperitoneal (1 mg/g), enquanto o Controle recebeu solução fisiológica 0,9% (5µL/g) (SULZBACHER et al., 2018). Em um período de 24 horas após a indução da sepse, estes animais foram eutanasiados para a coleta dos tecidos pulmonar e hepático para a análise de estresse oxidativo e expressão de iHSP70. (CEUA nº 048/2016).

Estresse oxidativo pulmonar e hepático

Para a mensuração dos parâmetros de estresse oxidativo, o pulmão e o fígado foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (KPi - PH 7,4) na proporção de 5 ml/g tecido pulmonar, ou 9 ml/g de tecido hepático, com 1µl de inibidor de protease (PMSF) para análises da atividade enzimática da SOD, através da auto-oxidação do pirogallol (MARKLUND; MARKLUND, 1974), e os níveis de lipoperoxidação (TBARS) (BUEGE; AUST, 1978).

Expressão de HSP70 pulmonar e hepática

Uma parte do pulmão e do fígado foi homogeneizado com dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% e inibidor de protease (PMSF). De cada homogeneizado foi realizado a dosagem de proteína pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e homogeneizados novamente a uma razão mínima para possuírem a mesma quantidade proteica (1µg/µL) com tampão para eletroforese (50Mm Tris PH 6,8, SDS 105 (w/v), glicerol 10% (v/v), β-mercaptoetanol 10% (v/v) e 2mg/ml de azul de bromofenol) e fervidas por 5 minutos para a desnaturação completa das proteínas. Em seguida foi realizado a técnica de imunodeteção (Westernblot), através da separação por eletroforese desnaturante de quantidades idênticas de proteínas carregadas em gel de poli(acrilamida)-dodecil sulfato de sódio, e fixação em membranas de nitrocelulose, e imunodeteção para HSP70 (H5147, 1:1000 e A9044, 1:15000) e a proteína normalizadora β-actina (A3854, 1:500000) em bloto 5%, a overnight. Para a quantificação da proteína foi utilizada sendo a dosagem dada em unidades arbitrárias de HSP70/β-actina).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão de iHSP70 pulmonar não foi modificada 24 horas após a indução da sepse (Figura 1A). Pode ser observado aumento da atividade da SOD no tecido pulmonar na sepse (Figura 1B). Isto ocorre na tentativa de neutralizar o aumento de ERO neste tecido (especial o ânion superóxido), de forma a atenuar/evitar um quadro de estresse oxidativo, que pode ocasionar a piora clínica e mortalidade na sepse (RITTER et al., 2003). No entanto, ocorreu maior lipoperoxidação pulmonar do grupo Sepse (Figura 1C), devido ao fato de que durante a sepse ocorrem alterações do metabolismo celular, das quais afetam lipídios, carboidratos e proteínas. Essas alterações podem culminar em dano oxidativo, ou ainda ativar vias que levam a apoptose (ABRAHAM ET AL., 2007).

Evento: XXVII Seminário de Iniciação Científica - BOLSISTAS DE GRADUAÇÃO UNIJUI

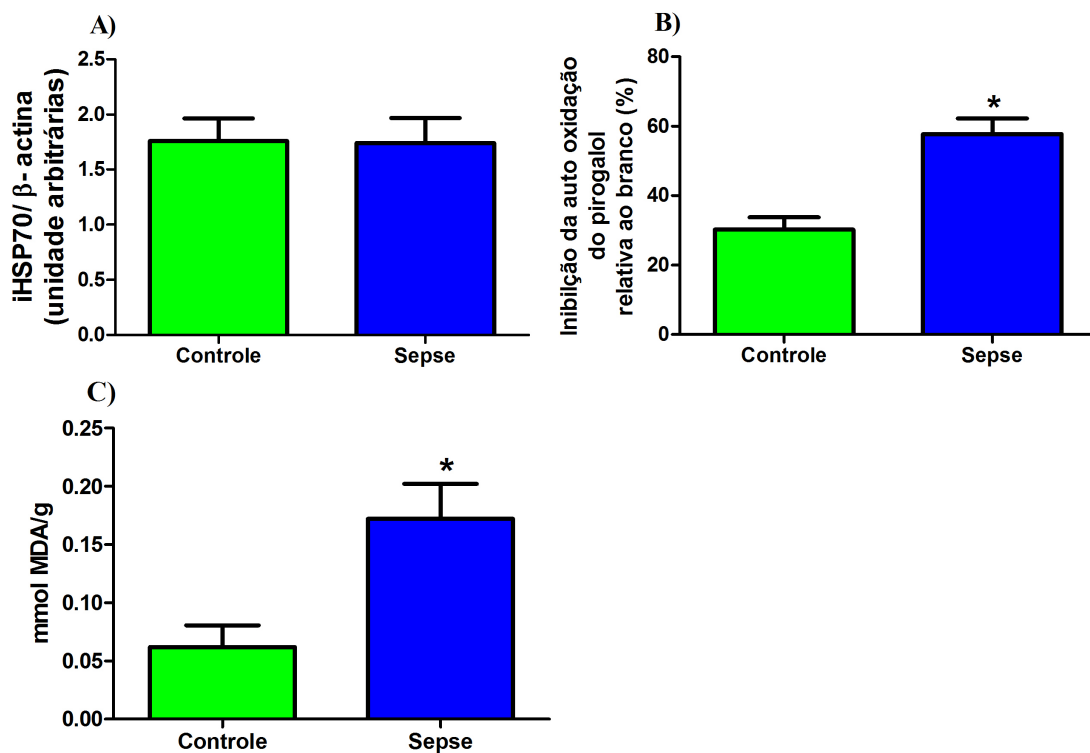


Figura 1. Expressão de iHSP70 (A), atividade da SOD (B), e lipoperoxidação pulmonar (C), 24 horas após indução de sepse com solução fecal 20% (1 mg/g). A análise estatística foi realizada através de teste T não pareado (* $p < 0,05$).

Quanto ao tecido hepático, verificou-se o aumento da iHSP70 (Figura 2 A). O estímulo infeccioso imediato pode induzir ao aumento da expressão celular de iHSP70 (EDELMAN, D. A. et al). Efeito antioxidante da iHSP70 pode ser observado no fígado dos animais Sepse, aonde não foi observado aumento da lipoperoxidação, sem a necessidade do aumento da atividade enzimática da SOD (Figura 2 B,C).

Evento: XXVII Seminário de Iniciação Científica - BOLSISTAS DE GRADUAÇÃO UNIJUI

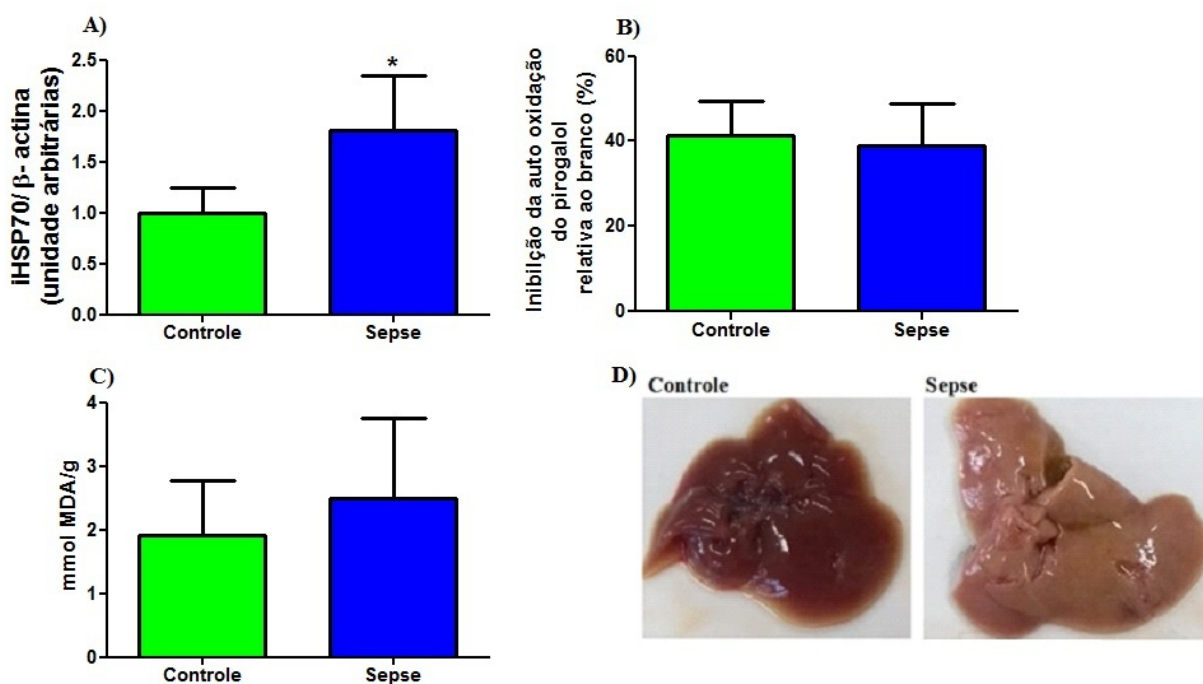


Figura 2. Expressão de iHSP70 (A), atividade da SOD (B), e lipoperoxidação do tecido hepático (C), e aspecto macroscópico do fígado 24 horas após indução de sepse com solução fecal 20% (1 mg/g). A análise estatística foi realizada através de teste T não pareado (* $p < 0,05$).

Os resultados também demonstram uma alteração da coloração do fígado, o que é um indicativo de acúmulo de lipídeos (esteatose), como observado anteriormente, e não pode ser reparado pelo aumento da iHSP70 no período experimental avaliado em nosso estudo (Figura 2D).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento da expressão da iHSP70 evita a lipoperoxidação hepática na sepse, sem a necessidade do aumento da atividade antioxidante da SOD. Enquanto no tecido pulmonar, a lipoperoxidação ocorreu, mesmo com o aumento da atividade da SOD, mas a expressão da iHSP70 não aumentou, o que pode significar que a iHSP70 diminui o estresse oxidativo.

Palavras-chaves: Tecido pulmonar; Fígado; Lipoperoxidação.

Keywords: Lung tissue; Liver; Lipoperoxidation.

REFERÊNCIAS:

ABRAHAM E, SINGER M. **Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction.** Crit Care Med. 2007; 35:2408-16.

ATALAY, M. et al. **Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats.** Journal of Applied Physiology, v. 97, p. 605 - 611, 2004.

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.

BEERE HM. **Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and**

Evento: XXVII Seminário de Iniciação Científica - BOLSISTAS DE GRADUAÇÃO UNIJUI

stress-inducible heat shock protein pathways. 2005.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. **Microsomal lipid peroxidation.** Methods in enzymology, v. 52, p. 302-10, jan. 1978.

CHUNG, K. W. et al. **The critical role played by endotoxin-induced liver autophagy in the maintenance of lipid metabolism during sepsis.** Autophagy, v. 8627, n. June, p. 00-00, 2017

DALIA M ET AL. **Pretreatment with magnesium ameliorates lipopolysaccharide4 induced liver injury in mice,** 2015.

EDELMAN, D. A. et al. **Lipopolysaccharide Up-Regulates Heat Shock Protein Expression in Rat Lung Pericytes.** Journal of Surgical Research, v. 140, n. 2, p. 171-176, 2007.

GANTCHEV TG, VAN LIER JE. **Catalase inactivation following photosensitization with tetrasulfonated metallophthalocyanines.** 1995.

GUTIERREZ LL. et al: **a redox-sensitive lipid imbalance suppressible by cyclopentenone prostaglandins.** Biochem Pharmacol 2008; 75(12): 2245-2262.

KORISH, A. A.; ARAFAH, M. M. **Camel milk ameliorates steatohepatitis , insulin resistance and lipid peroxidation in experimental non-alcoholic fatty liver disease.** BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 13, n. 29, p. 1-12, 2013.

LI, X. et al. **Hsp70 suppresses mitochondrial reactive oxygen species and preserves pulmonary microvascular barrier integrity following exposure to bacterial toxins.** Frontiers in Immunology, v. 9, n. JUN, 2018.

LI W. et al. **The therapeutic efficacy of glutamine for rats with smoking inhalation injury.** Int Immunopharmacol. 2013;16(2):248-53.

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. 469-74, 16 set. 1974.

RITTER, C. **Estresse oxidativo e o desenvolvimento da sepse.** 2003. p. 19. (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003

SULZBACHER, M.M. et al. **Efeitos do tratamento com glutamina via enteral em modelo animal de sepse.** Saúde (Santa Maria), V.44, n.2, p.1-10, 2018.

YUAN, X. et al. **Protective Effect of Hesperidin Against Sepsis-Induced Lung Injury by Inducing the Heat-Stable Protein 70 (Hsp70)/Toll-Like Receptor 4 (TLR4)/ Myeloid Differentiation Primary Response 88 (MyD88) Pathway.** Medical Science Monitor, v. 25, p. 107-114, 2019.