

Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica
ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

ALTERAÇÕES EM PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E SUAS CORRELAÇÕES COM NÍVEIS DE EHSP70 EM GESTANTES COM ACHADO ECOGRÁFICO DE SLUDGE¹

CHANGES IN OXIDATIVE STRESS PARAMETERS AND THEIR CORRELATIONS WITH EHSP70 LEVELS IN PREGNANT WOMEN WITH SLUDGE'S ULTRASOUND FINDING

Lucas Machado Sulzbacher², Jaíne Borges dos Santos³, Clarissa Chavez Ortiz Roberto⁴,
Matias Nunes Frizzo⁵, Thiago Gomes Heck⁶, Mirna Stela Ludwig⁷

¹ Trabalho de Pesquisa desenvolvido no Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF/UNIJUI)

² Acadêmico do curso de Enfermagem/UNIJUI. Bolsista PROBIC/FAPERGS. Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF/UNIJUI)

³ Mestranda do Programa de Pós-Graduação de Atenção Integral à Saúde (PPGAIS), UNIJUI/UNICRUZ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF/UNIJUI)

⁴ Mestranda do Programa de Pós-Graduação de Atenção Integral à Saúde (PPGAIS), UNIJUI/UNICRUZ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF/UNIJUI)

⁵ Docente do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS), Departamento de Ciências da Vida (DCVida/UNIJUI). Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF/UNIJUI)

⁶ Docente do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS), Departamento de Ciências da Vida (DCVida/UNIJUI). Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF/UNIJUI)

⁷ Docente do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS), Departamento de Ciências da Vida (DCVida/UNIJUI). Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF/UNIJUI). Orientadora.

INTRODUÇÃO: A prematuridade é considerada um problema de nível global, relacionada a alta morbidade e mortalidade (CELIK *et al.*, 2008), com uma taxa de prematuridade de 5-9% em países desenvolvidos, podendo chegar a 18% em países subdesenvolvidos (WHO, 2018). Grande parte das gestações que evoluem para um parto prematuro não apresentam fatores de risco durante o período gestacional, o que torna de suma importância novas formas de identificação de riscos para prematuridade (CELIK *et al.*, 2008), dentre elas, destacamos a presença de *sludge* no líquido amniótico (HUGHES *et al.*, 2016). O *sludge* é um achado ecográfico que pode apresentar fungos e bactérias, suspensas, que estão presentes no líquido amniótico, estando localizadas próximas ao orifício interno do colo uterino (JÚNIOR *et al.*, 2013).

Durante a gestação ocorre um aumento da atividade mitocondrial e uma maior demanda metabólica, o que irá acarretar em um desbalanço no equilíbrio redox do organismo, levando a um aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) que superam a capacidade do nosso sistema de defesa antioxidante, gerando assim um quadro denominado de estresse oxidativo. Pouco se sabe sobre a relação entre o quadro de estresse oxidativo e a presença do *sludge*. Os efeitos deteriorantes das EROs sobre estruturas celulares são também protegidos por meio do aumento da expressão de proteínas de choque térmico (*heat shock protein*) (WU *et al.*, 2015).

As proteínas de choque térmico (HSPs) foram descobertas no ano de 1960. Foram divididas conforme o peso molecular, entre as quais está a família de 70 kD ou HSP70 (MAIO, 2011). As funções dessas proteínas variam de acordo com o ambiente onde as mesmas se encontram. No ambiente intracelular (iHSP70) exercem uma função citoprotetoras, anti-inflamatório e anti-

Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

apoptótica (GARRIDO *et al.*, 2001). No ambiente extracelular plasmático (eHSP70) apresentam ações pró-inflamatórias e sinalizadoras de dano ou risco de dano celular (HECK *et al.*, 2011). Na gestação, esta proteína já foi detectada no líquido amniótico, na placenta e no plasma materno. A maioria dos estudos indica que gestantes saudáveis possuem níveis séricos de eHSP70 menor do que não grávidas saudáveis (MOLVAREC *et al.*, 2010). Já foi observado um aumento da eHSP70 no plasma de gestantes, em situações relacionadas a desfechos como o parto prematuro e a pré-eclâmpsia (MOLVAREC *et al.*, 2010).

Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros de estresse oxidativo e sua correlação com a concentração plasmática de eHSP70 em gestantes com achado ecográfico de *sludge*.

Palavras-Chave: Estresse Oxidativo, *Sludge*, HSP70

Keywords: Oxidative stress, *Sludge*, HSP70

METODOLOGIA: Trata-se de um estudo transversal, realizado com gestantes no segundo trimestre, atendidas na Secretaria Municipal de Saúde (SMS) do município de Ijuí-RS e em uma clínica de ultrassonografia da mesma cidade. Nas gestantes que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram realizadas ultrassonografia obstétrica e transvaginal. Todas as ultrassonografias foram realizadas por um único médico radiologista e o achado de *sludge*, de modo cego, confirmado por outro profissional médico especialista em Medicina fetal. O projeto foi aprovado pela Secretaria Municipal de Saúde do município de Ijuí-RS e CEP UNICRUZ (Parecer Número 3.255.646).

Com base nos achados ecográficos, as gestantes foram divididas em dois grupos: gestantes com presença de *sludge* e gestantes sem presença de *sludge*. Foi realizada punção venosa para coleta de sangue para fins de análise do perfil redox e concentração plasmática de eHSP70. **Critérios de Inclusão:** Gestantes em idade gestacional entre 15 e 26 semanas e 6 dias, que engravidaram espontaneamente e que assinaram o TCLE. **Critérios de Exclusão:** Mulheres com patologias infecciosas pré ou gestacionais, como STORCH (Sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, hepatites), HIV, hepatites, mulheres com doença autoimunes (lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, síndrome antifosfolipídica, asma), com história de trabalho de parto prematuro em gestação prévia, em uso de medicamentos no momento da coleta (anti-inflamatórios, corticóide, antibiótico, antidepressivos), com sangramento vaginal, história prévia de abortamento de repetição, sinais clínicos ou suspeita de infecção do trato geniturinário e fertilização assistida.

Lipoperoxidação: Foi analisada pelo método de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), à 505nm (BUEGE; AUST, 1975). Os resultados foram expressos em mmol MDA/mL de plasma.

A atividade da Superóxido Dismutase (SOD): foi determinada a partir da inibição da autooxidação do pirogallol, a 420nm (MARKLUND; MARKLUND, 1974). Os resultados foram expressos em

Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica
ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

USOD/mL de plasma.

A atividade da Catalase (CAT): foi determinada através da decomposição do peróxido de hidrogênio, a 240nm (AEBI, 1984). Os resultados foram expressos em UCAT/mL de plasma.

eHSP70: Foi determinada com a utilização de Kit comercial para ELISA HSP70 High Sensitivity (450 nm).

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Inicialmente analisamos os níveis de malonaldeído (MDA) no plasma das gestantes (Figura 1A). O MDA é o produto gerado através do processo de lipoperoxidação (BUEGE; AUST, 1975). Quando há um excesso de espécies reativas, ocorre a retirada de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular, fazendo com que ocorra a lipoperoxidação (WELCH; AVIS; DEN, 2002). Não foi observado diferença no nível de lipoperoxidação em gestantes com a presença de *sludge* comparativamente às sem *sludge*.

Um dos mecanismos utilizados pelo organismo, para evitar que ocorram danos oxidativos como a lipoperoxidação, é denominado de sistema de defesa antioxidante enzimático, sendo esse composto por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), sendo esta a primeira linha dessa defesa, que catalisa o superóxido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que, por sua vez, também tem potencial para gerar danos celulares. Para evitar que isso ocorra, a segunda linha dessa defesa é ativada. Trata-se da enzima denominada de catalase (CAT), capaz de converter o H₂O₂ em oxigênio e água, impedindo assim que ocorra um dano oxidativo (BARRA *et al.*, 2010). Quando analisamos essas enzimas e a razão entre elas, observamos que as gestantes com *sludge* não apresentam diferença na atividade da CAT, porém apresentaram valores menores da razão SOD/CAT (Figura 1C) e níveis menores da atividade da enzima SOD (Figura 1B), comparativamente às gestantes sem *sludge*. Estudos já mostraram que há uma diminuição da enzima SOD em gestantes com outras condições adversas, como a pré-eclâmpsia (AYDIN *et al.*, 2004). A diminuição da atividade da SOD indica uma diminuição da capacidade da defesa antioxidante o que pode predispor as gestantes com *sludge* a um maior risco de estresse oxidativo.

Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica
ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

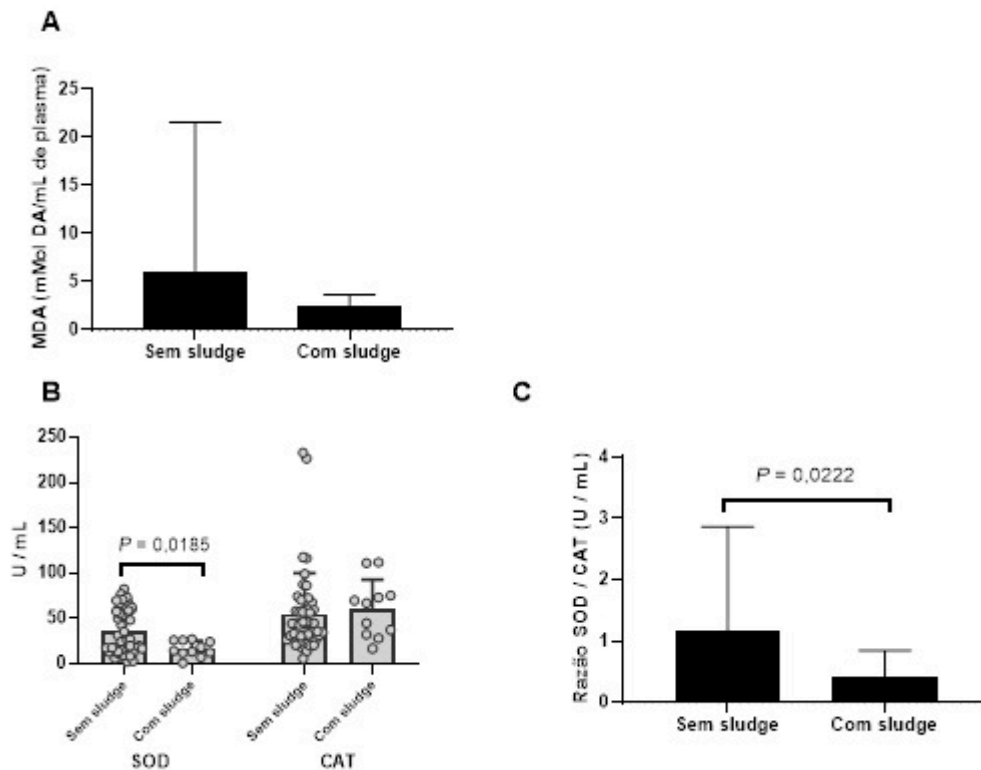


Figura 1. **A)** Avaliação dos níveis de malonaldeído. **B)** Avaliação dos níveis das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). **C)** Avaliação da razão SOD/CAT. Gestantes sem *sludge* (n=47) Gestantes com *sludge* (n=11) . Teste T de Student com correção de Welch.

Foram realizadas também análise de correlações entre os parâmetros do estado redox e com os níveis de eHSP70, onde se evidenciou uma correlação positiva entre os níveis da enzima catalase e da razão SOD/CAT com a concentração de eHSP70 em gestantes sem *sludge* (Figura 2), indicando que uma maior atividade enzimática da enzima catalase está correlacionada com uma maior concentração plasmática de eHSP70. Porém, o mesmo não se evidencia nas gestantes com *sludge* (Figura 3). Sabe-se que a gestação causa um aumento do metabolismo oxidativo do organismo, requerendo assim, um aumento da atividade de enzimas antioxidantes para contrapor o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (LU *et al.*, 2018), a fim de evitar o estresse oxidativo. Também, sabe-se que gestantes apresentam alteração na concentração de eHSP0 (MOLVAREC *et al.*, 2010) e de que esta proteína participa dos processos de defesa (WU *et al.*, 2015). Autores descrevem que em condições de estresse oxidativo, espécies reativas de oxigênio podem agir como sinalizadoras da indução da produção de HSP70 (WELCH, 1992). Estudos já mostraram que durante o período gestacional pode haver um aumento da eHSP70 e existir correlações entre essa proteína e parâmetros de estresse oxidativo em gestantes com pré-eclâmpsia (MOLVAREC *et al.*, 2010).

Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica
ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

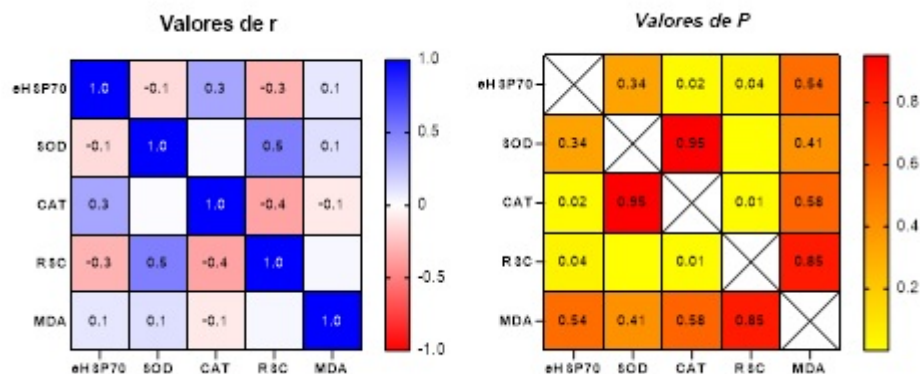


Figura 2. Mapa de correlações entre parâmetros de estresse oxidativo vs eHSP70, em gestantes SEM SLUDGE. Valores de *r* e de *P* expressos dentro de cada box, respectivamente. n= 49. Correlação de Pearson. eHSP70 (proteína de choque térmico de 70 kDa); MDA (malonaldeído); SOD (Superóxido Dismutase); CAT (Catalase); RSC (Razão SOD/CAT).

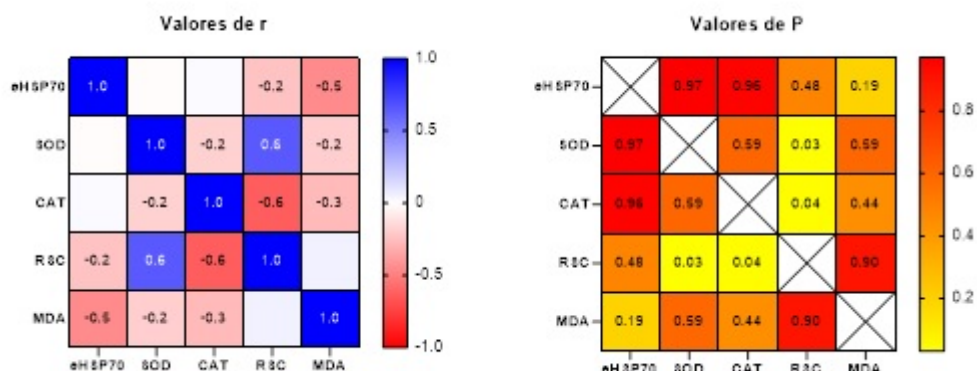


Figura 3. Mapa de correlações entre parâmetros de estresse oxidativo vs eHSP70, em gestantes COM SLUDGE. Valores de *r* e de *P* expressos dentro de cada box, respectivamente. n= 11. Correlação de Pearson. eHSP70 (proteína de choque térmico de 70 kDa); MDA (malonaldeído); SOD (Superóxido Dismutase); CAT (Catalase); RSC (Razão SOD/CAT).

CONCLUSÃO: Gestantes com o achado ecográfico de *sludge* apresentam menor resposta de defesa antioxidante enzimática quando comparadas a gestantes sem *sludge*, sem evidência de maior dano lipídico.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–6, jan. 1984.

BARRA, K. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

CELIK, E. et al. Cervical length and obstetric history predict spontaneous preterm birth: development and validation of a model to provide individualized risk assessment. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 31, n. March, p. 549–554, 2008.

GARRIDO, C. et al. Heat Shock Proteins: Endogenous Modulators of Apoptotic Cell Death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 286, n. 3, p. 433–442, 2001.

HUGHES, K. et al. Cervical length as a predictor of spontaneous preterm birth in highrisk singleton pregnancy - current knowledge. **Ultrasound In Obstetrics & Gynecology**, v. 48, n. 1, p. 7–15, 2016.

JÚNIOR, E. A. et al. Association of Progesterone , Pessary , and Antibiotic for Treating Pregnant Woman with Short Cervix Syndrome: Importance of Magnetic Resonance Imaging in the Assessment of Pessary Position. **Journal of Clinical Imaging Science CASE REPORT Editor in Chief**, v. 3, n. 2, p. 1–4, 2013.

LU, J. et al. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 17, p. 1–18, 2018.

MAIO, A. DE. Extracellular heat shock proteins , cellular export vesicles , and the Stress Observation System: A form of communication during injury , infection , and cell damage. **Cell Stress and Chaperones**, v. 16, p. 235–249, 2011.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. v. 474, p. 469–474, 1974.

MOLVAREC, A.; TAMÁSI, L.; LOSONCZY, G. Circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) in normal and pathological pregnancies. **Cell Stress and Chaperones**, v. 70, p. 237–247, 2010.

WELCH, J. Mammalian Stress Response: Cell Physiology , Structure / Function of Stress Proteins , and Implications for Medicine and Disease. **Physiological Reviews**, v. 72, n. 4, p. 1063–1081, 1992.

WELCH, K. E. D. W.; AVIS, T. Z. A. N. E. D.; DEN, M. A. R. C. E. V. A. N. E. Serial Review: Iron and Cellular Redox Status. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, n. 7, p. 577–583, 2002.

WU, C. W. et al. Induction of Antioxidant and Heat Shock Protein Responses During Torpor in the Gray Mouse Lemur, *Microcebus murinus*. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 13, n. 2, p. 119–126, 2015.



Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica
ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

Parecer CEUA: 076/15