

DANO OXIDATIVO HEPÁTICO E CONTEÚDO DE EHSP70 PLASMÁTICO EM MODELO EXPERIMENTAL DE CHOQUE TÉRMICO¹

Maicon Machado Sulzbacher², Analú Bender Dos Santos³, Eloísa Gabriela De Paegrin Basso⁴, Thiago Gomes Heck⁵, Mirna Stela Ludwig⁶, Maciel De Alencar Bruxel⁷.

¹ Projeto de iniciação científica

² Acadêmico de Enfermagem - UNIJUI

Bolsista PIBIT-UNIJUI

Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF - UNIJUI - maicon.sulzbacher@unijui.edu.br

³ Acadêmico de Educação Física - UNIJUI

Bolsista PIBIC UNIJUI

Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF - UNIJUI - analu.bender@gmail.com

⁴ Acadêmica de Ciências Biológicas - UNIJUI

Bolsista PET-Biologia

Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF - UNIJUI - elo_basso@hotmail.com

⁵ Professor do Departamento de Ciências da Vida - DCVida

Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF - UNIJUI - thiago.heck@unijui.edu.br

⁶ Professor do Departamento de Ciências da Vida - DCVida

Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF - UNIJUI - ludwig@unijui.edu.br

⁷ Aluno do Mestrado em Fisiologia Humana da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPef)- UNIJUI - mabruxel@yahoo.com.br

Introdução

Desafios causam aumento na produção de espécies reativas de oxigênio que, quando produzidas em excesso, colocam em risco a funcionalidade e a viabilidade celular, predispondo o organismo ao estresse oxidativo (Ferreira et al., 2007). A exposição celular a estresses pode aumentar a síntese de proteínas de choque térmico (HSP), em especial a HSP70 (70kDa) (De Maio et al., 2012), que é encontrada em diferentes compartimentos celulares e atua como chaperona molecular, desempenhando papel fundamental na manutenção da homeostase celular, protegendo os tecidos contra lesões, modulando a inflamação celular e promovendo a cicatrização tecidual (Atalay et al., 2009; Kim e Yenari, 2013).

O aumento da expressão da HSP70, em resposta ao tratamento com choque térmico, promove a melhora na sinalização celular da insulina, a diminuição do estresse celular, efeito cardioprotetor, entre outros (Geiger e Gupte, 2011). Entretanto, a HSP70 também pode ser exportada para o meio extracelular (eHSP70), onde esta proteína tem sido descrita como marcador de um estado pró-inflamatório, relacionada a diversas patologias e a um estado de estresse celular (Gelain et al., 2011). Neste contexto, a HSP70 é exportada com maior intensidade para o meio extracelular quando o organismo é submetido a situações de estresse em especial pelos tecidos hepatoesplênico e cerebral (Febbraio et al., 2002; Lancaster et al., 2004).

SALÃO DO CONHECIMENTO

UNIJUÍ 2013
Ciência • Saúde • Esporte



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXI Seminário de Iniciação Científica

Estando o estresse oxidativo aumentado em situações de estresse, assim como a eHSP70, o objetivo deste trabalho é verificar o dano oxidativo hepático e conteúdo de eHSP70 plasmático em modelo experimental de choque térmico.

Metodologia

Animais: 41 Ratos Wistar machos, com idade entre 2,5 à 3 meses, provenientes do Biotério da UNIJUÍ, mantidos em gaiolas semi-metabólicas, com temperatura e umidade do ar controladas ($22\pm 2^\circ\text{C}$; 50% à 60%), ciclos de 12 horas claro/escuro, ração padrão (Nuvilab CR-1) e água ad libitum.

Os animais foram divididos em dois momentos experimentais. Experimento 1: 24 animais divididos em grupo controle (CTRL, $n=12$) e choque térmico (HS, $n=12$), nos quais foi verificada a concentração plasmática de HSP70. Experimento 2: 17 animais divididos em grupo CTRL ($n=8$) e HS ($n=9$) para análise do dano oxidativo hepático.

Todos os animais foram anestesiados com Ketamina (90mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (10mg/ml) (ip). Os animais do grupo HS foram colocados em um recipiente com água (42°C), ficando com o corpo (exceto cabeça e membros dianteiros) imerso. Após elevação da temperatura retal até 41°C os animais permaneceram nesta condição durante 15 minutos. Então, foram retirados da água, secados e protegidos para evitar hipotermia. Os animais do grupo CTRL, depois de anestesiados, tiveram a temperatura retal aferida e protegidos de hipotermia. A temperatura corporal dos animais foi monitorada via retal (termômetro digital). Após a recuperação da anestesia, os animais receberam 3mL de solução de NaCl 0,9% (v.o.), para evitar a desidratação.

Os animais foram mortos com guilhotina nos tempos de 06, 12 e 24 horas após o choque térmico, coletado o sangue (em recipientes contendo EDTA 1mg/ml e inibidores de protease, para coleta do plasma) e o fígado (homogeneizadas em Tampão Kpi pH 7,4, com inibidores de protease).

A concentração de HSP70 foi determinada no plasma (Kit Enzo life EKS-715, no FisCel/URFGS) e a análise do dano oxidativo no fígado foi realizada pelo método de TBARS, por espectrofotometria à 535 nm (Buege e Aust, 1978). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976).

Análise estatística: Utilizou-se o programa GraphPad 3.0. Os resultados foram expressos em média \pm DP, para análise foi utilizado teste T de Student (unicaudal) considerando nível de significância estatística $p<0,05$.

Resultados e discussão

Os níveis de HSP70 no plasma (ng de eHSP/ml de plasma) não foram diferentes entre os animais dos grupos CTRL e HS nos tempos experimentais de 06 horas (CTRL (5,98 \pm 3,75 ng/ml); HS (6,28 \pm 4,74 ng/ml), ($p=0,472$) e 12h após o choque térmico CTRL (0,71 \pm 0 ng/ml); HS (12,16 \pm 13,48 ng/ml) ($p=0,0704$). Diferentemente, no tempo experimental de 24h após o choque térmico, a concentração plasmática de eHSP70 é maior no grupo submetido choque térmico (HS=15,90 \pm 9,07 ng/ml vs CTRL=5,52 \pm 3,29 ng/ml, $p=0,0375$). De maneira similar, os resultados relativos ao dano oxidativo (nmol de MDA/mg de prot), não foram diferentes entre os



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXI Seminário de Iniciação Científica

grupos nos tempos experimentais de 06h (CTRL=0,215±0,046 vs HS=0,214±0,019 nmol de MDA/mg de prot, p=0,4863) e 12h após o choque térmico CTRL=0,190±0,074 vs HS=0,188±0,053 nmol de MDA/mg de prot, p=4834). No tempo experimental de 24h após o choque térmico, os resultados apresentados pelos animais do grupo HS (0,327±0,029 nmol de MDA/mg de prot) indicam maior dano oxidativo hepático (p=0,0006) quando comparados aos animais do grupo CTRL (0,190±0,004 nmol/mg de prot).

Como descrito acima, os animais dos grupos CTRL e HS não apresentam diferença em relação ao dano oxidativo hepático e na concentração plasmática de HSP70, determinada 06 e 12h após o choque térmico, sugerindo não haver resposta diferente, nos parâmetros avaliados, entre os animais submetidos ao estresse celular (hipertermia) e os animais controle, nestes tempos experimentais. Contudo, os resultados apontam para uma resposta mais tardia, ou seja, 24h após o tratamento se observa dano oxidativo hepático e aumento da concentração plasmática de HSP70 nos animais submetidos a hipertermia, sugerindo possível relação entre o dano oxidativo e aumento de HSP70 no plasma. Gelain e cols (2011), estudando a sepse, mostraram relação semelhante, ou seja, observaram que a concentração plasmática de HSP70 pode ser modulada de acordo com o estado oxidativo dos pacientes sépticos, nos quais um perfil pró-oxidante (maior dano oxidativo) se correlaciona com níveis séricos de HSP70 mais elevados e, dentre estes, uma maior taxa de mortalidade.

Em estudo com protocolo de choque térmico semelhante ao utilizado neste trabalho, os pesquisadores constataram que a terapia de choque térmico aumenta os níveis de HSP70 intracelular até um período de 24h no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, diminuindo após 24h (Chung et al., 2008). Sabe-se também que a terapia de choque térmico e o aumento da expressão da HSP70 no ambiente intracelular é capaz de melhorar a sinalização insulínica e a defesa antioxidante, além de diminuir os fatores oxidantes em músculo esquelético (Chung et al., 2008; Geiger e Gupte, 2011). Considerando a correlação entre dano oxidativo e o aumento da HSP70 plasmática, as ações protetoras da HSP70 intracelular e o fato de que a sua concentração se encontra diminuída dentro das células após 24h do choque térmico e os resultados encontrados em nosso estudo, podemos sugerir que no período de 24h após o desafio (hipertermia), ressalta-se uma importante liberação desta proteína, predispondo as células hepáticas ao dano oxidativo. Por outro lado, pode ser o próprio dano oxidativo a causa para a liberação de HSP70. Outros estudos serão necessários para confirmar o efeito da HSP70 sobre o estresse oxidativo hepático, é possível visualizar uma relação entre o aumento da HSP70 e o dano oxidativo em condições de hipertermia.

Conclusão

O choque térmico produz aumento da concentração plasmática de HSP70 e maior dano oxidativo hepático no período de 24 horas após o desafio (hipertermia), sugerindo uma possível relação entre estas respostas.

Palavras chave: HSP70, estresse oxidativo, hipertermia.

SALÃO DO CONHECIMENTO

UNIJUI 2013
Ciência • Saúde • Esporte



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXI Seminário de Iniciação Científica

Referências Bibliográficas

- ATALAY, M. et al. Heat shock proteins in diabetes and wound healing. *Curr Protein Pept Sci*, v.10, n.1, p.85-95, 2009.
- CHUNG, J. et al. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.105, n.5, p.1739-44, 2008.
- DE MAIO, A. et al. Ferruccio Ritossa's scientific legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: a new view of biology, a new society, and a new journal. *Cell Stress Chaperones*, v.17, n.2, p.139-43, 2012.
- FEBBRAIO, M.A. et al. Exercise induces hepatoplanchnic release of heat shock protein 72 in humans. *J Physiol*, v.544, n.3, p.957-62, 2002.
- FERREIRA, F. et al. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. *Rev Port Cien Desp*, v.7, n.2, p.257-275, 2007.
- GEIGER, P.C.; GUPTE, A.A. Heat shock proteins are important mediators of skeletal muscle insulin sensitivity. *Exerc Sport Sci Rev*, v.39, n.1, p.34-42, 2011.
- GELAIN, D.P. et al. Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis. *Shock*, v.35, n.5, p.466-70, 2011.
- KIM, J.Y.; YENARI, M.A. The immune modulating properties of the heat shock proteins after brain injury. *Anat Cell Biol*, v.46, n.1, p.1-7, 2013.
- LANCASTER, G.I. et al. Exercise induces the release of heat shock protein 72 from the human brain in vivo. *Cell Stress Chaperones*, v.9, n.3, p.276-80, 2004.

