



DANO OXIDATIVO CEREBRAL EM PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE SEPSE POR PERITONITE

Autores: DONATO, Yohanna¹; -SULZBACHER, Maicon M.²; BENDER, Analú S.³; BASSO, Eloísa P.⁴; BASSO, Renan⁵; LUDWIG, Mirna⁶; HECK, Thiago G.⁷

Palavras-Chave: Infecção. Sepsis. Dano oxidativo. Cérebro

Introdução

A sepsis é classificada entre as primeiras causas de mortalidade em unidades de terapia intensiva. Sua incidência tem aumentado devido ao melhor suporte de vida para pacientes de alto risco, a utilização cada vez maior de procedimentos invasivos e o número crescente de indivíduos imunocomprometidos (ROBBINS & COTRAN, 2012).

A patogênese da sepsis é uma combinação de lesão microbiana direta e ativação, de respostas inflamatórias do hospedeiro (ROBBINS & COTRAN, 2012). Segundo os dados brasileiros referentes aos anos de 2005 a 2013, apresentados no Relatório Nacional do Instituto Latino Americano de Sepsis de 2013, os casos de sepsis no Brasil são de 16,7% nas unidades de terapia intensiva e mundialmente são de 11,5%. Destes, evoluem para óbito cerca de 57,1% no Brasil e 42,8% no mundo.

Em resposta a agentes infecciosos temos uma primeira resposta inflamatória ou resposta inata, onde os monócitos e os macrófagos fagocitam os patógenos aumentando o consumo de oxigênio. Consequentemente, ocorre aumento na produção de radicais livres de oxigênio por estas células que ocasionam dano oxidativo, podendo ser observado principalmente mediante a lipoperoxidação tecidual, que no caso da sepsis, leva a disfunção dos mesmos (Ritter, 2003).

A sepsis também causa alterações celulares e dano tecidual devido à hipóxia. No cérebro o tecido nervoso acometido leva o paciente a ter alterações do nível de consciência, variando desde um estado confusional leve até estupor e coma (BORGES, 1996). Esta alteração no tecido

¹ Graduanda no curso de Enfermagem da Unijuí, estagiária de Fisiologia Humana, CIEE - GPpF. E-mail: yohannadonato260@gmail.com

² Graduando no curso de Enfermagem da Unijuí, bolsista PIBITI CNPQ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPpF.

³ Graduanda no curso de Educação Física, bolsista PROBIC FAPERGS - GPpF.

⁴ Graduanda no curso de Biologia da Unijuí, bolsista PIBIC UNIJUÍ - GPpF.

⁵ Graduando no curso de Educação Física da Unijuí, bolsista PROBIC FAPERGS - GPpF

⁶ Professora do departamento de Ciências da Vida – DCVida da UNIJUÍ - GPpF

⁷ Professor do departamento de Ciências da Vida – DCVida da UNIJUÍ - GPpF.



cerebral também pode ser ocasionada pelo dano oxidativo que acomete este tecido logo no princípio da sepse, como pode ser verificado em alguns estudos com animais (STECKERT AV *et al*, 2013; SCHWALM MT *et al*, 2013). Este dano oxidativo cerebral deve-se ao fato deste órgão possuir maior taxa de consumo de O₂ por grama de tecido e dispor de poucas defesas antioxidantes, o que o torna mais suscetível durante a sepse (Lacombe., *et al* 2009).

Tendo em vista o papel do dano oxidativo na lesão tecidual, progressão e agravamento da sepse, este trabalho tem por objetivo desenvolver um protocolo experimental de sepse para observar o dano oxidativo cerebral.

Metodologia

Foram utilizados 8 camundongos da linhagem B6129SF2/J (B6) com aproximadamente 90 dias de idade, pesando 29±1g provenientes do biotério da UNIJUÍ. Estes foram divididos em dois grupos com 4 animais cada: grupo Controle experimental de sepse por peritonite (grupo Sepse). Os animais deste grupo receberam injeção de solução fecal 10% via intraperitoneal (i.p) e os do grupo controle, solução fisiológica 0,9% em uma dose de 5µL/g (ANDY PETROIANU *et al.*, 2004).

Preparou-se uma solução a 10%, com as fezes frescas dos animais. Após coletada as fezes, se fez um homogeneizado das mesmas em solução fisiológica 0,9% para que se tivesse uma concentração fecal de 10% - ex: 10g de fezes em 100 ml de NaCl 0,9%. Em seguida foi filtrado este homogeneizado através de gaze, para que fossem eliminadas as partículas maiores e em seguida centrifugada em centrífuga para eppendorf a 1000 G por 3s.

Os animais foram mortos por decapitação com tesoura 24 horas após injeção salina ou fecal 10%, coletado o cérebro, estes foram congelados com freeze clamp, resfriados com nitrogênio líquido e armazenados em freezer para posterior análise de dano oxidativo.

A análise do dano oxidativo lipídico foi realizada pelo método de TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico, por espectrofotometria à 535 nm. Os tecidos homogeneizados foram precipitados com 10% de ácido tricloroacético (TCA), centrifugados e incubados com ácido tiobarbitúrico (TBA) por 15 minutos a 100°C (Buege e Aust, 1978). A concentração de proteínas no cérebro foi determinada pelo método espectrofotométrico de Bradford, à 595nm (Bradford, 1976).

Análise estatística: Utilizou-se o programa GraphPad 3.0. Os resultados foram expressos em média + desvio padrão. Para a análise dos resultados foi utilizado teste T de Student considerando nível de significância estatística de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e discussão

O protocolo de sepse não causou aumento do dano oxidativo (nmol de MDA/mg de proteína) cerebral ($C = 0,759 \pm 0,129$ e $S = 0,840 \pm 0,223$, $P = 0,565$) 24 horas após a administração da solução fecal (figura 1).

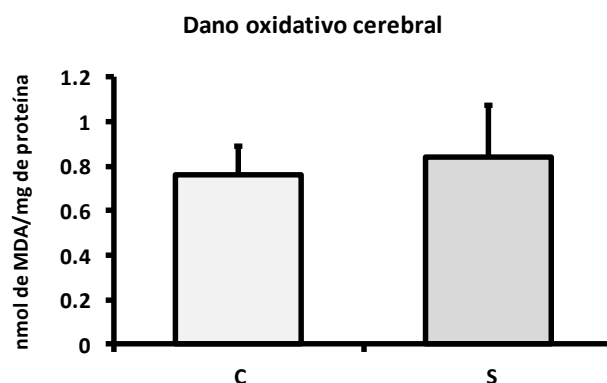


Figura 1. Dano oxidativo no cérebro em camundongos submetidos ao protocolo experimental de sepse por 24 horas, controle (C n=4) e sepse (S n=4).

Neste estudo, nossos resultados preliminares indicaram que não ocorreu diferença no dano oxidativo nos tecidos dos animais C e S. Como foi analisado um tecido de grande vascularização, com alto consumo de oxigênio, o mesmo seria lesado em caso de uma síndrome inflamatória sistêmica, portanto, presume-se que os animais em estudo ainda não estavam (em 24 horas) em um quadro de sepse, visto que o estresse oxidativo e a síndrome inflamatória sistêmica estão relacionados com a patologia (PRAUCHNER, PRESTES ADE E DA ROCHA, 2011). Embora tenha sido administrada uma solução fecal à 10% nos camundongos, acreditamos que o tempo pós-indução possa ser insuficiente para desencadear dano oxidativo.

Conclusão

O protocolo experimental de sepse por peritonite com solução fecal à 10%, não foi capaz de desenvolver o quadro de dano oxidativo cerebral presente em quadros de septicemia, com exposição de 24 horas.



Referindo-se a sepse e o dano oxidativo, estudos apontam que este ocasionam dano tecidual e disfunção orgânica, atingindo tecidos como o cérebro. Nossos resultados preliminares demonstram que não houve aumento de dano oxidativo cerebral, embora o mesmo tenha alto risco de injúria no quadro séptico (BORGES, 1996). Suspeita-se que os animais não desenvolveram o quadro de sepse no período de 24 horas ou que a concentração de material fecal tenha sido insuficiente para desencadear uma resposta inflamatória sistêmica, visto que o dano oxidativo está fortemente ligado a patologia (PRAUCHNER, PRESTES ADE E DA ROCHA, 2011).

Nossas perspectivas são de desenvolver trabalhos com tempo de exposição de 36 e 48 horas com soluções fecais mais concentradas, visando a padronização de um protocolo para indução de sepse nos animais.

Referências

- ANDY PETROIANU, T.-M. et al. Avaliação da reinfecção peritoneal após peritonite fecal em ratos. **Revista d o Colégio Brasileiro de Cirurgões**, v. 31, n. 2, p. 90-94, 2004.
- BORGES LAA. Choque séptico. **Clín Bras Med Intensiva**1: 101-107, 1996.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.
- HU YM, PAI MH, YEH CL, HOU YC, YEH SL. Glutamine administration ameliorates sepsis-induced kidney injury by downregulating the high-mobility group box protein-1-mediated pathway in mice. **Am J Physiol Renal Physiol** 302: F150–F158, 2012.
- ILAS, I. L. A. D. S.-. Campanha Sobrevivendo a Sepse. 2013. Disponível em: < <http://www.sepsisnet.org/> >. Acesso em: 22/07/2013.
- LACOMBE E, BAILLY-SALIN J, POLITO A, FRIEDMAN D, STEVENS R SHARSHAR T. Sepsis-associated encephalopathy and its differential diagnosis. **Crit Care Med** 2009; 37:S331-S336.
- PINTO, C. F. et al. The sepsis as cause of acute kidney injury: an experimental model. **Rev Esc Enferm USP**, v. 46 Spec No, p. 86-90, Oct 2012.
- PRAUCHNER, C. A.; PRESTES ADE, S.; DA ROCHA, J. B. Effects of diphenyl diselenide on oxidative stress induced by sepsis in rats. **Pathol Res Pract**, v. 207, n. 9, p. 554-8, Sep 15 2011.