



DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE POR PERITONITE E ANÁLISE DE DANO OXIDATIVO HEPÁTICO E RENAL

SULZBACHER, Maicon M.¹; BENDER, Analú S.²; BASSO, Eloísa P.³; BASSO, Renan⁴;
DONATO, Yohanna⁵; LUDWIG, Mirna⁶; HECK, Thiago G.⁷

Palavras-Chave: Sepses. Estresse oxidativo. Fígado. Rim

Introdução

A sepsis é definida como uma síndrome clínica constituída por uma resposta inflamatória sistêmica associada a um foco infeccioso, podendo determinar disfunção ou falência de múltiplos órgãos (GUYTON & HALL, 2011). Atualmente, cerca de 10 a 15% dos leitos das unidades de terapia intensiva brasileiras são ocupados por pacientes com sepsis, totalizando 400 mil casos da doença por ano, com taxa de mortalidade entre 10% e 64%. Em números absolutos, o número de óbitos iguala o do infarto agudo do miocárdio e supera aqueles causados por câncer de mama e AIDS (JUNCAL *et al.*, 2011).

Em resposta a um agente infeccioso temos em nossa primeira linha de defesa os monócitos e macrófagos que fagocitam os patógenos aumentando o consumo de oxigênio e por conseguinte, a produção de radicais livres de oxigênio. Contudo, quando ocorre um desbalanço na homeostasia e se instala um quadro de sepsis, há no organismo uma superprodução de radicais livres, os quais, por outra vez, ocasionam dano oxidativo principalmente através da lipoperoxidação, lesando os tecidos (RITTER, 2003; PASTOR & SUTER, 1999).

No tecido renal o aumento de radicais livres ocasiona dano endotelial e disfunção renal aguda, tornando o quadro de sepsis ainda mais severo. Possivelmente, a geração de espécies livres de oxigênio associada ao consumo da reserva antioxidante endógena seja o principal mecanismo precipitador dessa complicação (PINTO *et al.*, 2012). Outro tecido acometido primariamente na sepsis é o fígado. No quadro séptico são aumentadas as

¹ Graduando no curso de Enfermagem da Unijuí, bolsita PIBITI CNPQ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia – GPeF. E-mail: maicon.sulzbacher@unijui.edu.br

² Graduanda no curso de Educação Física, bolsita PROBIC FAPERGS. GPeF.

³ Graduanda no curso de Biologia da Unijuí, bolsita PIBIC UNIJUI. GPeF.

⁴ Graduando no curso de Educação Física da Unijuí, bolsita PROBIC FAPERGS. GPeF

⁵ Graduanda no curso de Enfermagem da Unijuí, bolsita Estagiária de Fisiologia Humana - CIEE. GPeF

⁶ Professora do departamento de Ciências da Vida – DCVida da UNIJUI. GPeF

⁷ Professor do departamento de Ciências da Vida – DCVida da UNIJUI. GPeF.



concentrações plasmáticas de proteínas hepáticas como proteína C reativa, antitripsina e fibrinogênio indicando lesão hepática, além de hiperlactecidemia (VARY & KIMBALL, 1992). Neste tecido também foi verificado dano oxidativo com lipoperoxidação aumentada em quadros sépticos experimentais (ÁVILA *et al.*, 2010).

Tendo em vista o papel do dano oxidativo na lesão tecidual e sua ocorrência na sepse, temos como objetivo elaborar um protocolo experimental de sepse para estudar o dano oxidativo renal e hepático.

Metodologia

Foram utilizados 16 camundongos da linhagem B6129SF2/J (B6) com 90 dias de idade, pesando 29 ± 1 g provenientes do biotério da UNIJUÍ. Estes foram divididos em dois grupos: controle (C) e sepse por peritonite (S). Os animais do grupo sepse receberam injeção de solução fecal 10% via intraperitoneal (i.p) e os animais do grupo controle, solução fisiológica 0,9% em uma dose de $5 \mu\text{L/g}$ (ANDY PETROIANU *et al.*, 2004). Este protocolo experimental foi desenvolvido em dois momentos: O 1º onde foram utilizados 8 animais sendo 4 controle e 4 sepse, mortos 12 horas após a administração da solução fecal ou fisiológica. No outro momento, 8 animais foram mortos 24 horas após receberem a injeção.

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

Os animais foram mortos por decapitação com tesoura para coleta do rim e do fígado, que foram congelados com *freeze clamp*, resfriado em nitrogênio líquido, e armazenados -20°C para posterior análise.

A análise do dano oxidativo foi realizada pelo método de TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrio, por espectrofotometria a 535 nm (Buege e Aust, 1978). A concentração de proteínas no rim e no fígado foi determinada pelo método espectrofotométrico de Bradford, à 595nm (Bradford, 1976).

Figura 4. Dano oxidativo hepático em camundongos submetidos ao protocolo experimental de sepse por 24 horas, controle (C n=4) e sepse (S n=4).



No que se refere ao dano oxidativo e sepse já é bem conhecido que o dano oxidativo indica lesão tecidual e disfunção orgânica, atingindo tecidos como renal e hepático (PINTO *et al.*, 2012). Os resultados preliminares do nosso estudo indicam que não ocorreu aumento de dano oxidativo nos tecidos analisados, nas condições experimentais aplicadas. Como foram analisados tecidos com alto risco de injúria no quadro séptico (BORGES, 1996) e como os mesmos não apresentaram dano oxidativo, suspeita-se que os animais não desenvolveram o quadro de sepse no período de até 24 horas ou que a concentração de material fecal foi insuficiente para produzir uma resposta inflamatória sistêmica, visto que o dano oxidativo está fortemente relacionado com a patologia (PRAUCHNER, PRESTES ADE E DA ROCHA, 2011).

Conclusão

O protocolo experimental de sepse por peritonite com solução fecal 10% não foi capaz de produzir aumento no dano oxidativo renal e hepático nos períodos de 12 e 24 horas após a administração da solução. A partir deste trabalho temos como perspectiva testar o protocolo por períodos de 36 e 48 horas. Em seguida, verificar a resposta dos animais a doses maiores da solução fecal com 20%, 30% e 50% para a indução da sepse.

Referências

- ANDY PETROIANU, T.-M. et al. Avaliação da reinfecção peritoneal após peritonite fecal em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 31, n. 2, p. 90-94, 2004.
- ÁVILA, T.V *et al.* Hepatic effects of flunixin-meglumin in LPSinduced sepsis. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 24, No.6, p 759-69, Dec 2010.
- 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.
- GUYTON E HALL. Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro. 2011. 1151 p.
- 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.



JUNCAL, V. R., L. A. BRITTO NETO, *et al.* Clinical impact of sepsis at admission to the ICU of a private hospital in Salvador, Brazil. **J Bras Pneumol**, v.37, n.1, Feb, p.85-92. 2011.

PASTOR, C. M.; SUTER, P. M. Hepatic hemodynamics and cell functions in human and experimental sepsis. **Anesth Analg**, 89, 344-352, 1999.

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.

VARY, T. C.; KIMBALL, S. R. Regulation of hepatic protein synthesis in chronic inflammation and sepsis. **Am J Physiol**, 262, C445-452, 1992.