

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS FLORIANÓPOLIS  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO FARMÁCIA

Hanna Pillmann Ramos

**Avaliação temporal de marcadores de estresse oxidativo e de dano de  
órgãos em modelo de choque hemorrágico**

Florianópolis

2022

Hanna Pillmann Ramos

**Avaliação temporal de marcadores de estresse oxidativo e de dano de órgãos em modelo de choque hemorrágico**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito para a conclusão da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II do Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Regina de Sordi  
Coorientador: Msc. Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ramos, Hanna Pillmann

Avaliação temporal de marcadores de estresse oxidativo e de dano de órgãos em modelo de choque hemorrágico / Hanna Pillmann Ramos ; orientador, Regina de Sordi, coorientador, Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira, 2022.

47 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Choque-hipovolêmico. 3. Estresse oxidativo. 4. Falência-múltipla-de-órgãos. I. de Sordi, Regina. II. Rodolfo Moreira Borges de Oliveira, Filipe. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

Hanna Pillmann Ramos

**Avaliação temporal de marcadores de estresse oxidativo e de dano de órgãos em modelo de choque hemorrágico**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis 26 de julho de 2022

---

Prof. Dra. Liliete Canes de Souza  
Coordenador do Curso

**Banca examinadora:**

---

Prof. Dra. Regina de Sordi  
Orientador

---

Prof. Dra. Renata Maria Lataro (Membro titular)  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Edson Luiz da Silva (Membro titular)  
Universidade Federal de Santa Catarina

## Agradecimentos

Gostaria de começar agradecendo a minha família e amigos. Especialmente meus pais, Denise e Luís, que me apoiaram em todos os momentos da minha vida, me incentivaram a batalhar pelos meus sonhos, a nunca desistir quando as dificuldades apareciam, e pelo amor incondicional durante toda a vida. A todos os meus familiares, pelo amor, incentivo, força e apoio incondicional.

Agradecer ao Ricardo, por estar ao meu lado durante todos esses anos, sendo meu alicerce, refúgio e aconchego. Obrigada por caminhar ao meu lado em direção ao nosso futuro.

Ao meu grupo de amigos que esteve comigo durante todos esses anos de graduação, Bruna, João, Thais, Vic, Virgínia, Vitória e Yasmim. Sem vocês não teria sido tão divertido essa jornada, mesmo com todos os momentos de desespero ao final de semestre. À Monique pelas caminhadas na beira-mar e conversas e desabafos infinitos. À Luana por fazer parte da minha vida a 10 anos, e sempre dedicar seu tempo para deixar palavras de incentivo, que fizeram com que eu fosse capaz de ser mais forte.

À Mayara, por estar sempre disponível para sanar as minhas dúvidas e me apoiando.

À equipe do Laboratório Farmacêutico Elofar, por aguentarem a minha ansiedade diária nos últimos meses.

À UFSC, aos docentes, diretores, coordenadores e administração que proporcionaram o melhor dos ambientes para que esse trabalho fosse realizado. Ao CNPQ por financiar os 4 anos de projeto PIBIC que participei.

Ao professor Edson por fazer parte da minha formação profissional e pessoal, sendo minha referência em educação, cultura e docência.

À Regina e ao Filipe pela oportunidade, apoio, confiança e orientação incansável durante todo o processo de construção do TCC. À equipe NOLAB e LabCaRe, Deborah, Jamil, Thi, Dai e Adri por todos os finais de semana, dias e noites de experimento, que foram muito leves e divertidas com vocês.

Aos membros da banca, Renata, Edson e Geisson por dedicarem seu tempo e conhecimento na avaliação desse trabalho.

E por fim, a todos que direta ou indiretamente participaram da minha formação, o meu eterno agradecimento.

## RESUMO

O dano de isquemia e reperfusão (I/R) é um mecanismo importante da complicação do estado de saúde de pacientes com choque hemorrágico (CH). Esse mecanismo acarreta em grandes danos aos órgãos podendo levar à falência de múltiplos órgãos (FMO), situação de grande relevância clínica por sua taxa de mortalidade e complicações. Uma das formas de se avaliar de forma experimental as consequências da FMO é utilizando de modelos pré-clínicos de CH. Visto que muitos estudos que avaliam dano de órgãos após um modelo de CH utilizam um único tempo de recuperação, existe um déficit na literatura sobre como é a evolução dessa condição. Nesse estudo foram avaliados indicadores de estresse oxidativo e de dano aos órgãos em diferentes tempos de recuperação após o dano de I/R induzido pelo modelo de CH em ratos. Para isso, ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos (n = 10 cada): falso-operado (sham; utilizado como controle), CH com recuperação de 2 h, 6 h e 24 h. Após o período de recuperação de cada grupo, os animais foram eutanasiados para a coleta de sangue e órgãos para análise do perfil do estresse oxidativo, e de dano de órgãos. Foram avaliados os marcadores (i)enzimas antioxidantes, tais como CAT, GPx (ii)produtos de oxidação como o MDA, GSSG (iii)GSH e grupamentos tióis (iv)estado oxidante total (TOS) e capacidade antioxidante total (TAC) (v)aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), lactato, creatinina e ureia. Foram encontrados os seguintes resultados: Grupo 2 h: Aumento de AST, ALT, Creatinina, Ureia sanguíneos, e diminuição de SH e CAT hepáticos. Grupo 6 h: Aumento de AST, ALT, Creatinina, Ureia sanguíneos, TBARS e SH renais. Diminuição da razão GSH/GSSG, CAT sanguíneos e SH e CAT hepáticos. Grupo 24 h: Aumento de AST, ALT sanguíneos, TBARS hepático e renal e SH renal. Diminuição da razão GSH/GSSG sanguínea e SH e CAT hepáticos. Utilizando da correlação de Pearson, constatou-se uma correlação entre o aumento do estresse oxidativo e o aumento de dano hepático. Não foi constatado a mesma correlação renal. Houve um aumento do estresse oxidativo, aumento de dano hepático e disfunção renal de forma geral, tendo uma piora ao longo do tempo de recuperação no dano hepático. Percebeu-se variações nos fatores antioxidantes entre os grupos de CH, o que pode indicar a atuação de mecanismos regulatórios como aumento da expressão das enzimas antioxidantes. Existe uma diferença de respostas entre os dois órgãos avaliados que vale a pena ser investigado, com o intuito de entender a fisiopatologia do dano de I/R em cada um deles. Com a contribuição desse estudo espera-se que outras pesquisas sejam capazes de elucidar mecanismos para o tratamento e diminuição da mortalidade causada pelo CH e dano de I/R.

**Palavras-chave:** Choque-hipovolêmico, Estresse-oxidativo, Falência-múltipla-de-órgãos

## ABSTRACT

Ischemia and reperfusion (I/R) damage is an important mechanism of health complication in patients with hemorrhagic shock (CH). This mechanism causes major organ damage and may lead to multiple organ failure (FMO), a situation of great clinical relevance due to its mortality rate and complications. One way to experimentally evaluate the consequences of FMO is through preclinical models of CH. Since many studies evaluating organ damage after a model of CH use a single recovery time, there is a deficit in the literature on how this condition evolves. In this study, we evaluated indicators of oxidative stress and organ damage at different recovery times after I/R damage induced by the CH model in rats. For this purpose, male Wistar rats were divided into four groups (n = 10 each): sham (used as control), CH with 2 h, 6 h and 24 h recovery. After the recovery period for each group, the animals were euthanized to collect blood and organs for analysis of oxidative stress profile, and organ damage. The markers (i) antioxidant enzymes such as CAT, GPx (ii) oxidation products such as MDA, GSSG (iii) antioxidant agents such as GSH and thiol groups (SH) (iv) total oxidant status (TOS) and total antioxidant capacity (TAC) (v) aspartate amino transferase (AST), alanine amino transferase (ALT), lactate, creatinine and urea were evaluated. Group 2 h: Increased blood AST, ALT, Creatinine, Urea, and decreased liver SH and CAT. Group 6 h: Increased blood AST, ALT, Creatinine, Urea, and renal TBARS and SH. Decreased blood GSH/GSSG ratio, blood CAT, and liver SH and CAT. 24 h Group: Increased blood AST, ALT, hepatic and renal TBARS and renal SH. Decreased blood GSH/GSSG ratio and hepatic SH and CAT. Using Pearson's correlation, a positive correlation was found between increased oxidative stress and increased liver damage. The same renal correlation was not found. There was an increase in oxidative stress, increased liver damage, and renal dysfunction overall, with a worsening over the recovery time in liver damage. Variations in antioxidant factors were seen between the CH groups, which may indicate the action of regulatory mechanisms such as increased expression of antioxidant enzymes. There is a difference in responses between the two organs evaluated that is worth further investigation in order to understand the pathophysiology of I/R damage in each of them. With the contribution of this study it is hoped that further research will be able to elucidate mechanisms for the treatment and reduction of mortality caused by CH and I/R damage.

Keywords: Hypovolemic Shock, Oxidative Stress, Multiple Organ Failure.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 1 - Reação da ação antioxidante da glutathiona reduzida sob a espécie reativa de oxigênio. .....	15
Figura 2 - Modelo experimental de choque hemorrágico.....	20
Figura 3 - Equação de transformação do peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) em água (H <sub>2</sub> O) e oxigênio (O <sub>2</sub> ) com ação da enzima catalase. ....	22
Figura 4 - Avaliação do dano hepático com dosagem de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). ....	27
Figura 5 - Avaliação da função renal pela dosagem de creatinina e ureia. ....	29
Figura 6 - Concentração de lactato. ....	30
Figura 7 - Capacidade antioxidante total (TAC) e status oxidante total (TOS).....	31
Figura 8 - Produto de peroxidação lipídica, malonaldeído (MDA) plasmático. ....	32
Figura 9 - Complexo da glutathiona.....	34
Figura 10 - Atividade da enzima antioxidante, catalase (CAT). ....	35
Figura 11 – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado. ....	36
Figura 12 - Grupos tióis (SH) no fígado e no rim .....	37
Figura 13 - Comparação da atividade da enzima antioxidante, catalase (CAT) no fígado (Gráfico A) e no rim .....	38
Figura 14 - Correlação da atividade da enzima antioxidante, catalase (CAT) em órgãos, com a concentração de parâmetros indicadores de dano hepático e de função renal.....	39
Figura 15 - Correlação da concentração de grupamentos tióis (SH) no fígado e no rim com parâmetros indicadores de dano hepático e de função renal. ....	40
Figura 16 - Correlação da concentração da glutathiona oxidada (GSSG) em sangue com parâmetros indicadores de dano hepático e de função renal. ....	41



**LISTA DE ABREVIATURAS**

- I/R – Isquemia-reperfusão  
ERO - Espécies reativas de oxigênio  
CH – Choque hemorrágico  
EO – Estresse oxidativo  
AST – Aspartato aminotransferase  
ALT – Alanina aminotransferase  
MDA – Malondialdeído  
GSH – Glutathiona reduzida  
GSSG – Glutathiona oxidada  
GPx – Glutathiona peroxidase  
TAC – Capacidade antioxidante total  
TOS – Status oxidante total  
TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1.1	DANO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO EM MODELO DE CHOQUE HEMORRÁGICO	12
1.2	ESTRESSE OXIDATIVO .....	13
1.2.1	<i>Marcadores do estresse oxidativo .....</i>	<i>14</i>
1.2.1.1	Complexo da glutatona e grupamentos tióis.....	14
1.2.1.2	Malondialdeído ( MDA) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	16
1.2.1.3	Capacidade antioxidante total (TAC) e status oxidante total (TOS) .	16
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	18
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
4.1	LOCAL DO ESTUDO .....	18
4.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	19
4.2.1	<i>Modelo de choque hemorrágico .....</i>	<i>19</i>
4.2.1.1	Desenho do estudo .....	20
4.2.2	<i>Avaliação do estresse oxidativo .....</i>	<i>20</i>
4.2.2.1	Determinação da Concentração de Hemoglobina.....	20
4.2.2.2	Determinação da Atividade Enzimática da Catalase (CAT).....	21
4.2.2.2.1	Catalase em sangue.....	21
4.2.2.2.2	Catalase em órgãos .....	21
4.2.2.3	Atividade da Glutaciona Peroxidase (GPx).....	22
4.2.2.4	Glutaciona Reduzida (GSH).....	22
4.2.2.5	Glutaciona Oxidada (GSSG) .....	23
4.2.2.6	Grupamentos SH em tecidos.....	24
4.2.2.7	Malondialdeído ( MDA) e Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	24
4.2.2.7.1	MDA no plasma.....	24
4.2.2.7.2	TBARS em órgãos.....	24

	11
4.2.2.8 Capacidade Antioxidante Total (TAC).....	25
4.2.2.9 Estado Oxidante Total (TOS) .....	25
4.2.3 <i>Avaliação do dano de órgãos</i> .....	26
4.2.3.1 Avaliações bioquímicas .....	26
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	26
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
5.1 DANO/FUNÇÃO DE ÓRGÃOS .....	26
5.2 ESTRESSE OXIDATIVO .....	30
5.2.1 <i>Sangue</i> .....	30
5.2.2 <i>Órgãos</i> .....	36
5.3 CORRELAÇÃO ENTRE DANO DE ÓRGÃOS E ESTRESSE OXIDATIVO .....	38
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Dano por isquemia-reperfusão em modelo de choque hemorrágico

A hipoperfusão dos tecidos, com conseqüente diminuição da chegada de nutrientes e oxigênio, resulta em isquemia tecidual. A forma mais lógica de se tratar isquemia é restabelecer a perfusão aos tecidos. Porém, quando um órgão se mantém por um período sem ou com baixa oxigenação, e é reperfundido, isso gera o dano de isquemia-reperfusão (I/R). Primeiramente na isquemia a produção de trifosfato de adenosina (ATP) pela mitocôndria fica diminuída, fazendo com que ocorra uma indução do metabolismo anaeróbico nas células com o objetivo de restabelecer a produção de ATP. O metabolismo anaeróbico por sua vez, produz uma quantidade significativa de ácido láctico e diminui a produção de espécies antioxidantes. Quando este tecido é reperfundido, a passagem de sangue e oxigênio acarreta na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que encontra um ambiente com déficit de antioxidantes, e gera uma resposta inflamatória bastante intensa (WU *et al.*, 2018) . Diversas condições podem acarretar em uma isquemia, como aterosclerose, sepse, transplante de órgãos e principalmente o choque hemorrágico (CH).

O CH ocorre quando há uma perda sanguínea considerável, acarretando uma resposta compensatória inicial, diversos mecanismos são ativados com a finalidade de manter a pressão sanguínea em níveis que garantam a correta perfusão tecidual. Dentre essas respostas, a mais importante é a ativação do sistema simpático causando uma vasoconstrição periférica. Com a contínua perda sanguínea, o corpo perde a capacidade compensatória, diminuindo, portanto, a perfusão dos órgãos. Com a hipóxia causada pela falta de sangue, os órgãos passam a produzir ácido láctico derivado da respiração anaeróbica, causando um dano celular, que por sua vez gera ERO (MOORE, 2014).

A principal forma de tratamento do CH é a reperfusão de fluidos, sendo principalmente salino ou concentrado de hemácias. O intuito dessa manobra é de devolver o volume dentro dos vasos, mas principalmente de restabelecer a oxigenação dos órgãos. Na maior parte das vezes, essa reperfusão se dá de forma agressiva, para que o paciente retorne a valores de pressão arterial normais o mais rápido possível. Mas como já citado anteriormente, a reoxigenação dos órgãos também causa danos importantes à saúde do indivíduo, visto que isso faz com que todos os mediadores pró- inflamatórios e as ERO gerados durante a isquemia circulem por todo o corpo gerando uma resposta inflamatória sistêmica que pode levar a falência de múltiplos órgãos (FMO) (DEWAR *et al.*, 2009; ELTZSCHIG; ECKLE, 2011).

Sabe-se que a FMO é causada principalmente por uma resposta inflamatória sistêmica, com produção exacerbada de fatores que modulam a inflamação. Esta resposta inflamatória acontece como uma tentativa de defesa a um dano sofrido, porém, por ser uma resposta extrema e desregulada, acaba causando uma disfunção orgânica (TSUKAMOTO; CHANTHAPHAVONG; PAPE, 2010). Essa disfunção orgânica fica caracterizada por parâmetros de estresse oxidativo elevados, e marcadores de dano de órgãos importantes alterados, como por exemplo, ocorre aumento de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), lactato, creatinina e ureia. AST e ALT são utilizadas como marcadores hepáticos, e seu aumento indica um dano celular, entretanto, como a AST também está presente em outros tecidos, não é um marcador tão específico como a ALT. Porém, a dosagem desses dois fatores é muito utilizada para a identificação, controle e prognóstico de diversas doenças que afetam o fígado (KEW, 2000; LUEDDE; KAPLOWITZ; SCHWABE, 2014). A disfunção renal pode ser avaliada pelos biomarcadores, ureia e creatinina séricos, que irão avaliar a função dos rins (KRSTIC *et al.*, 2016). O lactato, é muito utilizado para avaliação de pacientes em situação de hipoperfusão de tecidos, por ser aumentado quando as células entram em metabolismo anaeróbico, sendo um importante avaliador de prognóstico para esses pacientes (ANDERSEN *et al.*, 2013; OKORIE; DELLINGER, 2011).

## 1.2 Estresse oxidativo

Como mencionado anteriormente, a FMO gerada pelo CH e pelo dano de I/R tem como consequência um aumento na produção de ERO, podendo causar um aumento do estresse oxidativo. A definição mais atualizada de estresse oxidativo é de que se trata de um desequilíbrio entre as espécies oxidantes e antioxidantes, tendo como predominante as espécies oxidantes, levando a uma perturbação da sinalização e controle redox e/ou a um dano molecular (SIES, 2015).

O estresse oxidativo pode ser ocasionado pelo aumento de ERO como também pela diminuição dos antioxidantes endógenos ou exógenos. Sabe-se que essa condição está relacionada com diversas doenças como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e doenças inflamatórias crônicas, por exemplo, e pode ser uma condição derivada ou causadora da doença (PISOSCHI; POP, 2015).

Diversos fatores contribuem para o balanço entre espécies oxidantes e antioxidantes. Os antioxidantes podem ser classificados entre enzimáticos e não enzimáticos e todas as células contêm enzimas antioxidantes, que tem o poder de eliminar as ERO, evitando o dano celular.

As principais classes de enzimas antioxidantes são catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), existindo ainda outras de importância clínica (SIES, 1996).

Durante o processo de I/R que acontece no CH, há o aumento de neutrófilos circulantes que causam danos aos tecidos pelo processo indiscriminado de apoptose e necrose, levando ao aumento considerável de ERO, aumentando o estresse oxidativo (BOTHÁ *et al.*, 1995). As ERO têm um importante papel pró-inflamatório, e seu aumento contribui para o estabelecimento de uma resposta inflamatória sistêmica, tendo um grande impacto nos danos aos tecidos e, portanto, na FMO (PARIHAR *et al.*, 2008).

O aumento do estresse oxidativo pode ser classificado de forma temporal ou por intensidade. A classificação temporal divide o estresse oxidativo em agudo ou crônico. O processo agudo se dá por um aumento das espécies reativas de oxigênio devido algum fator gatilho, porém com a ação rápida e efetiva das enzimas antioxidantes o equilíbrio volta rapidamente ao normal. Nesse caso não é necessária nenhuma ativação de mecanismos gênicos para maior produção de enzimas antioxidantes, somente as que já estão em circulação ou presentes nas células são suficientes para o restabelecimento do equilíbrio. Já em um processo crônico é necessária a ativação desses mecanismos regulatórios, e esse aumento das ERO se mantém por horas, dias ou até por mais tempo LUSHCHAK; STOREY (2021).

Na classificação por intensidade, nós temos a relação entre o aumento de ERO e as consequências desse aumento no organismo, tendo como indicadores do estresse as enzimas antioxidantes que podem ser induzíveis ou inativadas pelo aumento de ERO, e os produtos celulares e extracelulares resultantes de reações com as ERO, como lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos (LUSHCHAK; STOREY, 2021).

As ERO, por se tratarem de moléculas altamente reativas e de baixa meia vida são dificilmente avaliadas por ensaios de laboratório (KLISIC *et al.*, 2020). Dessa forma, é necessário avaliar o estresse oxidativo utilizando dosagens de produtos secundários, também conhecidos como marcadores do estresse oxidativo. Esses marcadores, além de informar a situação do estresse oxidativo, também tem suas peculiaridades, que podem gerar danos celulares e respostas inflamatórias secundárias a sua produção.

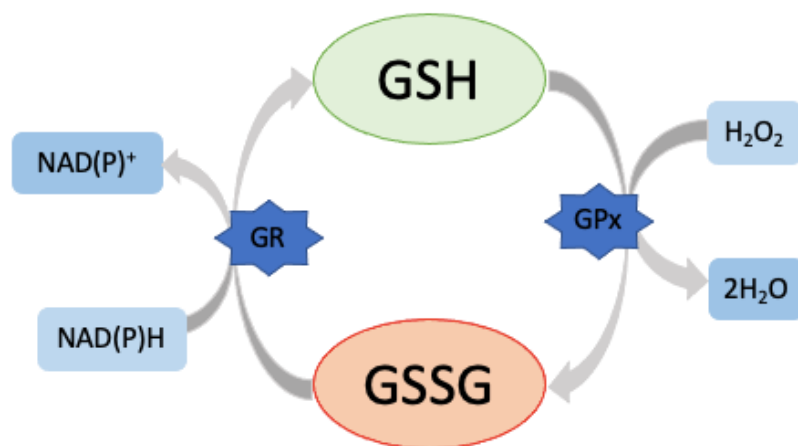
## 1.2.1 Marcadores do estresse oxidativo

### 1.2.1.1 Complexo da glutathiona e grupamentos tióis

A GSH exerce um papel antioxidante no organismo, esse papel se dá com a reação de redução de  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio) em  $H_2O$  (água) e glutathiona oxidada (GSSG), que

ocorre com atuação da GPx, agindo como um catalisador da reação. A GSSG, quando em maiores concentrações no meio intra e extracelular, tem um potencial citotóxico. Como forma de proteção a esse possível dano causado pelo aumento de GSSG, as células contêm em seu citosol a enzima glutathiona redutase (GR) que atua na redução de GSSG em GSH, por meio da oxidação do NAD(P)H (Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) em NAD(P)<sup>+</sup>. Dessa forma, o acúmulo de GSSG é evitado, e a quantidade de GSH é restabelecida (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009).

Figura 1 - Reação da ação antioxidante da glutathiona reduzida sob a espécie reativa de oxigênio.



Fonte: a autora. Adaptada de (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009).

GSH com peróxido de hidrogênio com ação da enzima glutathiona peroxidase resultando em sua oxidação (GSSG) e formação de água para posteriormente, ser reduzida pela ação da enzima glutathiona redutase, retornando a GSH. GSSG: Glutathiona oxidada; GSH: glutathiona reduzida; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; H<sub>2</sub>O: molécula de água; GR: glutathiona redutase; GPx: glutathiona peroxidase.

A glutathiona na sua forma reduzida é classificada como um tiol, ou seja, contém em sua estrutura grupamentos sulfidrílicos (SH). Apesar de a GSH ser a forma mais predominante de grupamento tiol reduzido que encontramos, existem outros grupamentos tiois que tem importância nos mecanismos de sinalização inflamatória que ocorre durante o estresse oxidativo que estão presentes na circulação e nos tecidos. E dependendo da metodologia de análise utilizada, é possível avaliar a GSH separadamente, ou os grupos tiois como um todo (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009).

### 1.2.1.2 Malondialdeído (MDA) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O MDA é um produto da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados. O aumento desse derivado é ocasionado pela ação de ERO, podendo causar efeitos citotóxicos, mutagênicos e aumentar a evolução de algumas doenças (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005).

O potencial do MDA de causar danos se deve a sua alta reatividade com outras moléculas, principalmente as de ácidos nucleicos, reação responsável pelo seu efeito mutagênico. Outra ação já comprovada do MDA é a sua capacidade de interação com frações oxidadas de lipoproteínas causando uma interação com macrófagos, e dessa forma levando a um aumento da formação de placas ateroscleróticas, aumentando o risco cardiovascular (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005).

Por essa relação do MDA com danos cardiovasculares e mutagênicos, se tornou de grande importância avaliar a concentração desse produto de oxidação em estudos de estresse oxidativo. Para isso podemos analisa-lo de duas formas, usando de um método conhecido como TBARS (do inglês, *Thiobarbituric acid reactive substances*), que utiliza o ácido tiobarbitúrico (TBA) na reação, e com a avaliação colorimétrica é capaz de determinar todas as espécies que reagem com esse composto. Porém, com esse método não só o MDA é avaliado, mas todas as moléculas que podem reagir com o TBA, trazendo resultados imprecisos para a concentração do marcador, mas ainda de relevância para avaliação do estresse oxidativo. Dessa forma, estudou-se outras formas de avaliar o MDA, e atualmente alguns estudos utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para uma dosagem mais precisa e sensível desse marcador (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005).

### 1.2.1.3 Capacidade antioxidante total (TAC) e status oxidante total (TOS)

Fisiologicamente vivemos em um equilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes, e uma das formas de avaliarmos esse equilíbrio é utilizando da dosagem de TAC e TOS. A TAC é um marcador capaz de avaliar a atividade antioxidante completa na amostra a ser utilizada e vem sendo estudada para avaliação do consumo de dietas ricas em componentes antioxidantes, na avaliação de diferentes condições de saúde (doenças crônicas, estresse oxidativo, etc) e também em tratamentos para essas condições de saúde (FRAGA; OTEIZA; GALLEANO, 2014). Já o marcador TOS, avalia a presença de todas as espécies oxidantes presentes na amostra, sendo capaz de demonstrar o aumento dessas espécies após a ocorrência de algum evento traumático, ou a exposição a determinadas substâncias.



### 1.3 Estresse oxidativo e a FMO

Alguns marcadores do estresse oxidativo já foram avaliados em casos de CH, como o malondialdeído (MDA) que se apresentou elevado em animais submetidos a modelo de I/R comparados a animais falso-operados (YANG, Q.-S. *et al.*, 2015). Também foi demonstrado que nesses casos agentes antioxidantes estão diminuídos, a exemplo da glutathiona reduzida (GSH) (YANG, L.; DONG, 2017; YANG, Q.-S. *et al.*, 2015).

Em modelos animais, além de poder ser avaliado o estresse oxidativo de forma mais generalizada, dosando indicadores no sangue, pode-se utilizar a avaliação de parâmetros em órgãos para a compreensão de como o processo de I/R afetou o estresse oxidativo, e se causou dano ao tecido avaliado. Assim como no sangue, nos órgãos também é possível avaliar enzimas antioxidantes, agentes antioxidantes e produtos de oxidação, a exemplo da CAT, grupamentos tiois (SH) e MDA, respectivamente. Essa avaliação local é importante, pois já foi demonstrado que os órgãos se comportam de maneiras diferentes na I/R (GRANGER; KVIETYS, 2015).

A maioria dos estudos que avaliam dano a órgãos ou estresse oxidativo em modelos de isquemia-reperfusão fazem a análise após um único tempo após a reperfusão, não sendo possível avaliar se trata-se de um estresse agudo ou crônico (ESIÖBU; CHILDS, 2018; YANG, L.; DONG, 2017; YANG, Q.-S. *et al.*, 2015). E também não é avaliado qual o desfecho desses animais após tempos diferentes de recuperação.

## 2 JUSTIFICATIVA

O choque hemorrágico (CH) tem grande importância epidemiológica a nível mundial. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2021) cerca de 4,4 milhões de pessoas morrem de trauma no mundo todos os anos, sendo que a hemorragia é uma das principais causas dessas mortes (KAUVAR; LEFERING; WADE, 2006).

Dentre todas as causas de trauma, que podem levar a uma hemorragia, os acidentes de trânsito correspondem a 30% dessas mortes. Somente no Brasil, em 2013 (ANDRADE *et al.*, 2017), foram observadas 170.805 hospitalizações por conta de acidentes de trânsito. Considerando que a principal ação tomada quando um paciente chega ao hospital com hemorragia, é a reperfusão de fluidos, essa manobra, embora necessária, pode levar ao desenvolvimento da FMO devido ao processo de I/R, aumentando a estadia de muitos pacientes nas UTI.

A longa estadia em hospitais aumenta os riscos de contrair doenças secundárias, como as infecções hospitalares, e possível evolução para um quadro de sepse que tem uma alta taxa de mortalidade (MATHEW *et al.*, 2018; SINGER *et al.*, 2016).

Poucos estudos tem como objetivo relacionar o dano de I/R com o dano de órgãos, e estresse oxidativo. Dessa forma, a nossa hipótese é que acontecerá um aumento do estresse oxidativo em decorrência do dano de I/R, com uma piora do quadro com o passar do tempo de recuperação. Entender como se comportam esses marcadores no organismo ao longo do tempo após a exposição ao trauma e a reperfusão de fluidos, tanto em órgãos como no sangue, pode servir de base para estudos futuros que buscam entender e aplicar uma linha de tratamento que evite, ou atenuar os danos causados pela reperfusão.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar marcadores de estresse oxidativo e de dano de órgãos em diferentes tempos após a indução do CH em ratos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- I. Avaliar o status do complexo da glutationa no sangue, com a dosagem de: glutationa reduzida, oxidada e peroxidase (GSH, GSSG, GPx, respectivamente) e relação GSH/GSSG;
- II. Avaliar marcadores antioxidantes em sangue e em órgãos, utilizando a dosagem de TAC, no soro, grupamentos SH em órgãos e CAT no sangue e em órgãos;
- III. Avaliar marcadores oxidantes em sangue e em órgãos, utilizando a dosagem do TOS no soro, MDA no plasma e TBARS em órgãos;
- IV. Verificar parâmetros bioquímicos (lactato, AST, ALT, creatinina, ureia) para avaliação de dano e função hepático e renal;
- V. Correlacionar indicadores do estresse oxidativo com indicadores de dano/função de órgãos.

### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Local do estudo**

Os animais utilizados no estudo foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da UFSC. As cirurgias e protocolo experimental foram realizadas no Laboratório

de Doenças Cardiovasculares e Renais (LabCaRe), também localizado no Departamento de Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da UFSC (Responsável Prof.<sup>a</sup> Regina de Sordi), e parte das análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Lipídeos e Aterosclerose (Responsável Prof. Edson Luiz da Silva), localizado no Departamento de Análises Clínicas do Centro de Ciências da Saúde da UFSC e no Laboratório Multiusuário (LAMEB) da UFSC..

Todos os protocolos a serem utilizados nesse trabalho foram aprovados pela CEUA (nº7396250219).

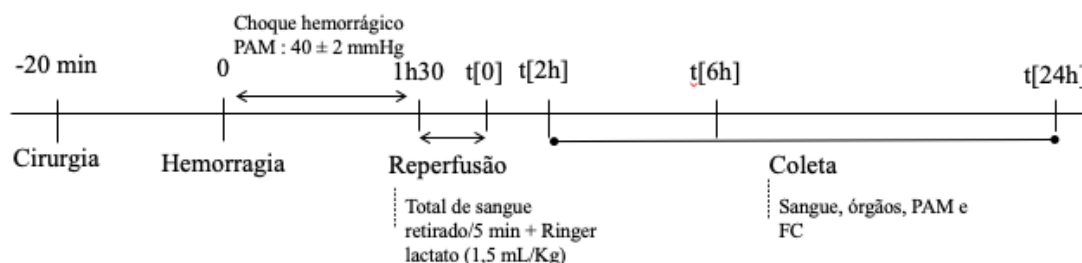
## 4.2 Protocolo experimental

### 4.2.1 Modelo de choque hemorrágico

O modelo de CH foi realizado de acordo com trabalhos prévios com algumas modificações (MIRA *et al.*, 2016; SORDI *et al.*, 2015, 2016). Ratos Wistar machos receberam inicialmente tramadol (10 mg/kg, i.p.). Dez minutos depois foram anestesiados com injeção intramuscular (região superior da coxa direita) de cetamina e xilazina (100 e 10 mg/kg, respectivamente) e posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida. Inicialmente a artéria femoral foi localizada e dissecada para a inserção de uma cânula de polietileno (PE10) e agulha, sendo que essa via foi utilizada para duas finalidades: (1) foi conectada a um transdutor de pressão (Mikro-Tip®, Millar Instruments, Inc., Huston, Texas, USA) acoplado a um equipamento de análise de pressão arterial Powerlab 8/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia) por onde foi realizado o registro da pressão arterial média (PAM) do animal e frequência cardíaca (FC); e (2) foi a via utilizada para a retirada do sangue do animal até que este atingisse uma pressão arterial média de  $40 \pm 2$  mmHg. O sangue foi coletado na presença de heparina (200 U/dL) para evitar a formação de coágulos, e foi armazenado na geladeira durante o período de choque, e retirado cerca de 20 min antes da etapa de reperfusão para alcançar a temperatura ambiente. A veia femoral foi localizada e dissecada para a inserção de uma cânula de polietileno e seringa para a posterior administração do sangue retirado do animal (ressuscitação) e fluidos. A PAM do animal foi mantida em  $40 \pm 2$  mmHg por 90 minutos com posteriores retiradas de sangue do animal durante a fase de compensação, ou com a administração de pequenas quantidades de sangue durante a fase de descompensação. Após 90 minutos, foi realizada a ressuscitação do animal com o sangue retirado em um período de 5 minutos. Ao final da ressuscitação, os animais receberam 1,5 mL/kg de ringer lactato via canulação da veia femoral. Após a ressuscitação, nos animais de 6 e 24 h as cânulas foram retiradas, os vasos ligados e a pele da coxa suturada. Os animais foram mantidos em ambiente

aquecido até a recuperação da anestesia e receberam tramadol a cada 12 h (5 mg/kg s.c.). Já os animais de 2 h foram mantidos anestesiados e canulados até o momento da coleta.

Figura 2 - Modelo experimental de choque hemorrágico.



Fonte: Figura elaborada pela autora.

t[0]: final da reperusão; t[2 h]: 2 horas após final da reperusão; t[6 h]: 6 h após final da reperusão; t[24 h]: 24 h após final da reperusão; PAM: Pressão arterial média; FC: Frequência cardíaca.

#### 4.2.1.1 Desenho do estudo

Foram utilizados 40 animais no estudo, sendo eles divididos igualmente (n=10) para cada grupo experimental.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- Falso operado (sham) – animais submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos dos animais CH, porém sem sofrer hemorragia e reperusão;
- Choque hemorrágico 2 h (CH 2) – animais submetidos ao protocolo de CH, e após 2 h do término da reperusão submetidos à coleta;
- Choque hemorrágico 6 h (CH 6) – animais submetidos ao protocolo de CH, e após 6 h do término da reperusão submetidos à coleta;
- Choque hemorrágico 24 h (CH 24) – animais submetidos ao protocolo de CH, e após 24 h do término da reperusão submetidos à coleta;

#### 4.2.2 Avaliação do estresse oxidativo

##### 4.2.2.1 Determinação da Concentração de Hemoglobina

As concentrações de hemoglobina nas amostras foram determinadas utilizando um kit comercial (Labtest). Neste método, o Fe(II) do grupo heme da hemoglobina, oxihemoglobina e carboxihemoglobina é oxidado ao estado férrico pelo ferricianeto formando hemiglobina (Hi),

que se combina com o cianeto ionizado para produzir cianeto de hemoglobina (HiCN), o qual é medido em 540 nm.

#### 4.2.2.2 Determinação da Atividade Enzimática da Catalase (CAT)

##### 4.2.2.2.1 Catalase em sangue

Neste ensaio, baseado em protocolos já conhecidos (JOHANSSON; HÅKAN BORG, 1988; WHEELER *et al.*, 1990) a atividade enzimática da catalase foi determinada pela sua função peroxidativa. O método se baseia na reação da enzima com metanol em presença de uma concentração ideal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nessa reação é produzido formaldeído, o qual é medido colorimetricamente com Purpald. O reagente Purpald forma um heterocíclo bicíclico com aldeídos que, ao oxidar, passa a ter cor roxa. Apesar de ser possível medir a atividade enzimática da catalase por este método em diferentes tipos de amostra, para o presente estudo foi utilizado sangue hemolisado.

Para isso, em uma placa de 96 poços, foi pipetado 100 µL de tampão fosfato (pH 7,0), 30 µL de metanol 30%, 20 µL da amostra (hemolisado) ou padrão (formaldeído 5,15, 30, 45, 60 e 70 µM) e 20 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em todos os poços para iniciar a reação. Após isso a placa foi coberta e incubada à temperatura ambiente por 20 min. Depois da incubação foi pipetado 30 µL de KOH 10 M, para encerrar a reação, e 30 µL de Purpald e esperou-se que a solução ficasse levemente roxa. A placa foi coberta e incubada no agitador de microplacas à temperatura ambiente por 10 min. Após 10 min, foi pipetado, 10 µL de periodato de potássio e incubada no agitador de microplacas à temperatura ambiente por 5 min. Ao fim foi lido a absorbância em 540 nm no leitor de placas.

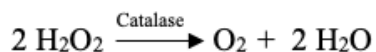
Após os cálculos, foi expressa a atividade da catalase por grama de hemoglobina da amostra.

##### 4.2.2.2.2 Catalase em órgãos

As amostras de fígado e rim dos animais foram preparadas, em nitrogênio líquido, utilizando tampão PBS para formação do homogenato, após todo o preparo foram mantidas em gelo até a análise. Utilizando placa de 96 poços, foi pipetado 10µL de amostra preparada e 190µL de tampão, contendo em torno de 3 a 5 µg de proteína por poço de análise. Foi realizada uma primeira leitura da placa, para medir a absorbância do branco, e em seguida, 10µL de peróxido de hidrogênio 0,5 M foi pipetado em todos os poços. Imediatamente foi iniciada a leitura espectrofotométrica em 240 nm, em intervalos de 15 segundos durante 5 minutos.

A técnica mediu o decaimento do peróxido de hidrogênio consumido pela catalase, conforme reação mostrada na Figura 2. A cada unidade de catalase na amostra, 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi consumido por minuto a  $25^\circ\text{C}$  em pH 7,0 (AEBI, 1984).

Figura 3 - Equação de transformação do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e oxigênio ( $\text{O}_2$ ) com ação da enzima catalase.



Fonte: Elaborado pela autora.

Após os cálculos os resultados foram expressos em unidade de Catalase/mg de proteína na amostra.

#### 4.2.2.3 Atividade da Glutationa Peroxidase (GPx)

Conforme WENDEL, 1981 a atividade da GPx pode ser medida pela taxa de oxidação do fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) na presença de GSH e glutatona redutase (GR). Em placa de 96 poços foi pipetado  $82,5 \mu\text{L}$  de tampão fosfato  $143 \text{ mM}$  pH 7,5 EDTA  $1 \text{ mM}$ ,  $125 \mu\text{L}$  de NADPH  $0,29 \text{ mM}$ ,  $12,5 \mu\text{L}$  de GSH  $20 \text{ mM}$ ,  $2,5 \mu\text{L}$  de GR  $10 \text{ U/mL}$ ,  $12,5 \mu\text{L}$  de t-butil- hidroperóxido  $10 \text{ mM}$ ,  $2,67 \mu\text{L}$  de KCN  $9 \text{ mM}$  e por fim  $10 \mu\text{L}$  da amostra (hemolisado). Imediatamente após a pipetagem da amostra foi lido a absorbância em  $340 \text{ nm}$ , no modo cinético, com uma leitura por minuto durante 3 minutos em leitor de placas (ELISA). Com a realização de cálculos, a atividade enzimática foi obtida em U/mg de hemoglobina da amostra.

#### 4.2.2.4 Glutationa Reduzida (GSH)

Utilizando protocolo já publicado anteriormente (GIUSTARINI *et al.*, 2013) foi determinada a concentração de GSH em amostra de sangue coletada em tubo com EDTA, e no momento da coleta já foi misturado com  $100 \mu\text{L}$  de N- Ethylmaleimide (NEM)  $310 \text{ mM}$  para evitar a oxidação da GSH durante o armazenamento. No preparo da amostra foi misturado  $100 \mu\text{L}$  de TCA (ácido tricloroacético)  $15\%$  por mL de sangue. Foi agitado no vórtex e centrifugado a  $14,000 \text{ g}$  por 2 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante límpido foi filtrado em membrana de  $22 \text{ micras}$  e então injetado no HPLC.

O HPLC estava equipado com uma coluna C18 (4.6 x 150 mm, 5  $\mu$ m) e um detector UV-Vis. Foi utilizado duas fases móveis A) Ácido acético 0,25%; B) Acetonitrila grau HPLC. A corrida foi feita com 94% de fase A e 6% de fase B com taxa de fluxo de 1,25 mL por minuto, com análise no comprimento de onda 265 nm com 400 nm como referência. Após os cálculos o resultado da concentração foi obtido em  $\mu$ mol/g de hemoglobina da amostra.

#### 4.2.2.5 Glutathiona Oxidada (GSSG)

Tendo como base protocolo já publicado anteriormente (GIUSTARINI *et al.*, 2013) a GSH reage com o ácido ditionitrobenzóico (DTNB) formando o tiolato, tionitrobenzóico (TNB), de cor amarela com absorvância máxima em 412 nm. Na presença de NADPH e GR, é obtido também a quantificação da GSSG. A GSH é convertida em Glutathiona Dissulfeto (GSSG: forma oxidada da GSH), a qual é enzimaticamente reduzida pela GR. A GSH é a forma predominante em organismos. Na presença de GR e NADPH, a GSSG resultante da primeira reação (ou aquela que já estava presente na amostra) é reconvertida em GSH que é reoxidada a GSSG formando mais TNB (ácido tionitrobenzóico). A formação do TNB é monitorada a 412 nm espectrofotometricamente. Como a quantidade de GR é constante e os demais substratos (como NADPH e DTNB) são adicionados em quantidades saturantes, a velocidade de formação de TNB (Absorvância Máxima em 412 nm) é proporcional à quantidade inicial de GSH (e de GSSG) nas amostras. Conforme a reação prossegue, o DTNB vai sendo consumido enquanto a GSH (e/ou a GSSG) é reciclada. Ou seja, volta para a primeira reação.

As amostras de sangue foram coletadas em tubo com EDTA, e no momento da coleta já foi misturado com 100  $\mu$ L de N-Ethylmaleimide(NEM) 310 mM para evitar a oxidação da GSH, que formaria GSSG durante o armazenamento, causando uma interferência no resultado.

O ensaio enzimático de 2 minutos foi realizado em 925  $\mu$ L de tampão fosfato PB2000,2 M pH 7,4, contendo 20  $\mu$ L de NADPH e 5  $\mu$ L de DTNB. Foi adicionado a essa mistura 20  $\mu$ L de amostra, o tubo foi agitado, e após isso colocou-se a mistura em cubeta para espectrofotômetro. Foram adicionados e homogeneizados 20  $\mu$ L de glutathiona redutase 20 UI/mL, a absorvância foi lida a cada 20 segundos durante 1 minuto. Ao término desse primeiro minuto foram adicionados 10  $\mu$ L de GSSG 10  $\mu$ M, homogeneizado e a absorvância foi lida a cada 20 segundos durante 1 minuto. Todas as leituras foram feitas em 412 nm.

Após cálculos, os resultados foram obtidos em nM de GSSG por g de hemoglobina da amostra.

#### 4.2.2.6 Grupamentos SH em tecidos

As amostras foram preparadas da mesma forma descrita no item 4.2.2.2.2. O preparado foi centrifugado a 3000 rpm, e retirado o sobrenadante para dosagem de proteínas, que estavam entre 30 a 100 µg para prosseguimento da dosagem de SH. Com as proteínas dosadas foi pipetado em placa de 96 poços a amostra em volume que correspondi a faixa de proteína desejada, PBS 10 mM 170 µL qsp., 35 µL de tampão e por fim 10 µL de DTNB. A placa foi agitada, e deixada em temperatura ambiente por 1h para incubação, durante esse período os grupamentos SH e grupos tiólicos, como a GSH, reagiram com o DTNB formando o TNB (ELLMAN, 1959). Foi realizada a leitura da absorbância em 412 nm. Após os cálculos os resultados foram expressos em mol de SH/ mg de proteína.

#### 4.2.2.7 Malondialdeído (MDA) e Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

##### 4.2.2.7.1 MDA no plasma

A avaliação da peroxidação lipídica plasmática ou tecidual é realizada pela detecção do MDA, produto de oxidação de lipídeos, após a sua reação com o ácido tiobarbitúrico, conforme procedimento descrito previamente (DOMIJAN *et al.*, 2015). Aliquotas de 50 µL de plasma-EDTA diluído 10 x em água foram misturadas com 100 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,6% recém-preparado e 400 µL de ácido o-fosfórico 1%. A mistura foi incubada a 90-100 °C durante 15 min. Após resfriamento em água com gelo, foi adicionado 0,5 mL de butanol e os tubos foram agitados (vortex) por 30 s e centrifugados a 3000 x g por 5 min. O sobrenadante (fase butanólica) foi filtrado em membranas de 0,22 µm e injetado na coluna C18 do HPLC, conforme metodologia descrita por Domijan et al. (2015), com modificações. Como fase móvel no HPLC foi utilizado uma solução de Fosfato de Potássio monobásico Sigma Aldrich (50 mmol/L) e Metanol (60:40) com fluxo de 0,900 mL/min. O forno foi aquecido a 50 °C e o comprimento de onda utilizado foi de 532 nm. Foi injetado no equipamento um volume de 20 µL. O resultado final foi obtido em µM.

##### 4.2.2.7.2 TBARS em órgãos

Utilizando a técnica conhecida como TBARS em que as extremidades aldeídicas dos lipoperóxidos reagem com o ácido tiobarbitúrico em meio ácido e altas temperaturas e formam um composto quantificado em espectrofotômetro, descrita no periódico *Methods in Enzymology* (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990), foi realizada a quantificação de malondialdeído em rim e fígado dos animais do estudo.



Com as amostras homogeneizadas em tampão, foi realizado a quantificação das proteínas, tendo como faixa ideal para a análise 1 a 10 mg por amostra. Foi pipetado volume necessário de amostra em eppendorff para respeitar a faixa ideal de proteína. Neste mesmo eppendorff foi pipetado 100  $\mu\text{L}$  qsp. de PBS 10 mM, adicionado 200 $\mu\text{L}$  de TCA 15%. A mistura foi agitada em vortex e posteriormente foi centrifugada a 10000 g por 10 min, em temperatura de 4-10 °C. 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram transferidos para outro eppendorff com 200  $\mu\text{L}$  de TBA 0,67%, essa mistura foi aquecida durante 40 min a 80 °C. Após esfriarem durante 10 min, 250  $\mu\text{L}$  foram transferidos para o poço da placa de 96 poços e a absorbância foi lida em 532 nm. Após os cálculos os resultados foram expressos em nmol de TBARS/mg de proteína.

#### 4.2.2.8 Capacidade Antioxidante Total (TAC)

O método se baseia na habilidade dos antioxidantes bloquearem o cátion radical estável ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic diammonium salt)), um cromóforo azul-esverdeado com absorção máxima em 660 nm, em comparação com a capacidade antioxidante do Trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E. A adição de antioxidantes ao cátion radical pré-formado (azul-esverdeado) o reduz à ABTS com a consequente descoloração da solução. A extensão da descoloração, como percentagem de inibição do cátion radical ABTS, é determinada em função da concentração da amostra teste e calculada em comparação com a reatividade do Trolox. Os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TAC), definida como a concentração da substância sob investigação (mM, por exemplo) que tem a atividade antioxidante equivalente a 1,0 mM de Trolox (BOTSOGLOU *et al.*, 2008; EREL, 2004; PELLEGRINI *et al.*, 2001).

#### 4.2.2.9 Estado Oxidante Total (TOS)

Oxidantes presentes na amostra de soro oxidam o complexo formado com o íon ferroso e a o-dianisidina para íon férrico. A reação é facilitada pelas moléculas de glicerol presentes em grande quantidade no meio reacional. O íon férrico forma um complexo colorido com o alaranjado de xilenol em meio ácido. A intensidade da cor é proporcional ao número total de moléculas presentes, e pode ser lida em espectrofotômetro. O ensaio foi calibrado com peróxido de hidrogênio e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Equiv./L (EREL, 2005).

#### 4.2.3 Avaliação do dano de órgãos

##### 4.2.3.1 Avaliações bioquímicas

As análises de AST, ALT, creatinina e ureia foram realizadas utilizando kits bioquímicos disponíveis comercialmente. O lactato foi obtido com a utilização do aparelho monitor Accutrend Plus (La Roche).

#### 4.3 Análise estatística

Os dados obtidos das análises bioquímicas foram tabulados em planilhas do Excel para realização dos cálculos dos resultados das análises e estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Foi utilizado o teste de Grubb's para identificação de outliers (alfa = 0,05), os valores identificados como outliers foram retirados das análises posteriores. Os resultados passaram pelo teste de Shapiro-Wilk para avaliar a distribuição dos dados, e a homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste de Bartlett. Quando necessário, os valores foram transformados em valores logarítmicos para atingir a normalidade e homogeneidade das variâncias. Para analisar a diferença entre os grupos foi utilizado a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste post-hoc de Tukey. Para análise das correlações entre métodos foi utilizado o teste de correlação de Pearson seguido de uma regressão linear, tendo um valor de  $r$  que pode variar entre um valor de -1 (correlação negativa), 0 (sem correlação) e +1 (correlação positiva) (MUKAKA, 2012). Um valor de  $p$  inferior a 0,05 foi considerado significativo. Os dados foram analisados por meio do software GraphPad Prism® 9.0 (Califórnia, EUA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Dano/função de órgãos

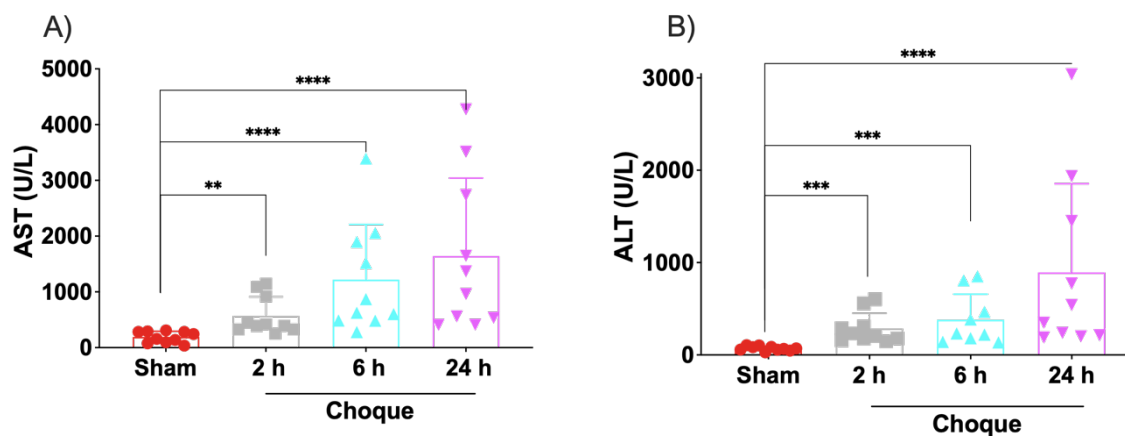
Com o intuito de avaliar o dano hepático causado pelo modelo de CH utilizado no estudo, foram avaliados os marcadores AST e ALT no plasma. Foram realizadas dosagens em 3 diferentes tempos de recuperação após o choque, e no grupo falso operado.

Comparando os resultados da AST nesses grupos, é possível identificar um aumento da concentração ao longo do tempo de recuperação, sendo o grupo Sham com concentração de  $191,1 \pm 102,1$  U/L grupo com duas horas de recuperação  $569,5 \pm 341,6$  U/L, seis horas de recuperação  $1.221 \pm 988,5$  U/L e 24 h de recuperação  $1.642 \pm 1.398$  U/L.

O padrão segue o mesmo para os resultados da ALT nesses grupos, tendo o grupo Sham com concentração de  $70,30 \pm 24,68$  U/L, grupo com duas horas de recuperação  $285,9 \pm$

164,8 U/L, seis horas de recuperação  $379,8 \pm 277,6$  U/L e 24 h de recuperação  $893,0 \pm 960,5$  U/L. Sendo todos os grupos CH significativamente maiores que o grupo Sham ( $*p < 0,05$ ), tanto para a AST quanto para a ALT, conforme pode ser visualizado na Figura 4.

Figura 4 - Avaliação do dano hepático com dosagem de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).



AST e ALT em U/L no soro dos animais do grupo controle (Sham) (n=10), e nos grupos que passaram pelo modelo de CH com diferentes tempos de recuperação pós insulto, sendo eles: 2 h (n=10), 6 h (n=10) e 24 h (n=10). Valores representados pela média  $\pm$  desvio padrão, considerando  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ,  $****p < 0,0001$  (ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey).

Apesar de alguns estudos questionarem a relação entre a elevação das enzimas hepáticas com a necrose desse tecido, esses índices ainda são muito utilizados como marcadores de lesão hepática (CONTRERAS-ZENTELLA; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, 2016). A AST, está presente em outros tecidos, como músculo esquelético e cardíaco por exemplo, e sua elevação pode indicar dano a esses tecidos. Já a ALT, apesar de também estar presente em outros tecidos, a sua concentração nos hepatócitos é significativamente maior, e por isso a sua elevação pode indicar mais especificamente uma lesão hepática, principalmente se vier em conjunto com uma elevação de AST.

Outros estudos que avaliaram o efeito de substâncias para a mitigação dos efeitos danosos da I/R ao fígado, demonstraram resultados similares no aumento na concentração plasmáticas de enzimas hepáticas após a aplicação do modelo de CH similar ao realizado nesse trabalho. Em um estudo publicado em 2009, as enzimas hepáticas de ratos foram avaliadas após a indução do choque hemorrágico com duração de 60 minutos, com duas horas de recuperação após reperusão. E obtiveram como resultado, um aumento significativo nas enzimas ( $\mu\text{g/mL}$ ),

no grupo CH (ALT  $149\pm 28$  e AST  $234\pm 24$ ) comparado ao grupo Sham (ALT  $73\pm 9$  e AST  $119\pm 10$ ) (HURT *et al.*, 2009).

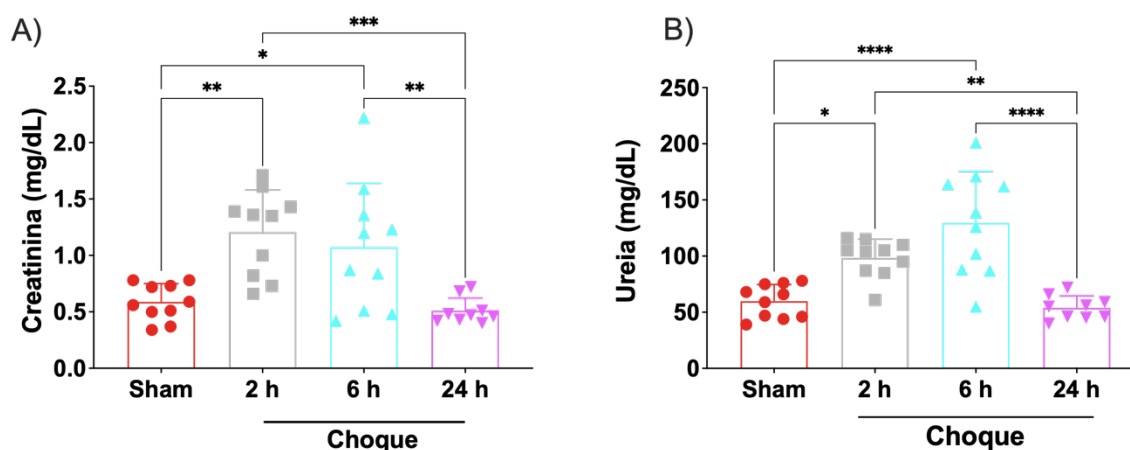
Outro estudo de 2021, analisou as enzimas hepáticas em ratos após 14 h da reperfusão após CH com duração de 90 min na fase hipovolêmica. Nesse estudo, os animais do grupo sem tratamento foram reperfundidos com o sangue, assim como no nosso trabalho, e também com um veículo de dimetilsulfóxido (DMSO). E obtiveram resultados similares ao aumento das enzimas hepáticas quando comparados ao grupo Sham. Nesse estudo eles também, avaliaram a histologia hepática, confirmando o dano hepático, e a relação entre o aumento das enzimas (OBERT *et al.*, 2021).

A avaliação de dano hepático pode ser realizada utilizando da medição das enzimas hepáticas, porém, quando o intuito é avaliar dano renal, a ureia e creatinina não são capazes de prever o dano. O que é possível realizar segundo a literatura é uma avaliação da função renal utilizando desses indicadores. Isso se deve a esses dois marcadores não serem intracelulares como a AST e ALT no fígado, e, portanto, o seu aumento não indica necessariamente morte celular e extravasamento dessas substâncias no plasma.

A creatinina e a ureia são dois metabólitos do organismo que têm sua excreção praticamente exclusiva pelos rins, e dessa forma, o seu aumento pode indicar uma baixa taxa de filtração glomerular (TFG), que é o principal indicador de função renal (BAUM; DICHOSO; CARLTON, 1975).

Foram obtidos resultados de ureia (mg/dL) e creatinina (mg/dL) que indicam que após a indução da I/R, os animais dos grupos de 2 h - Creatinina  $1,206 \pm 0,3744$  e Ureia  $98,30 \pm 16,86$  - e 6 h - Creatinina  $1,072 \pm 0,5673$  e Ureia  $129,5 \pm 45,97$ - de recuperação, tiveram um aumento nesses parâmetros quando comparados ao grupo Sham - Creatinina  $0,5880 \pm 0,1616$  e Ureia  $59,8 \pm 14,79$  -  $*p < 0,05$ . Já com o tempo de 24 h de recuperação - Creatinina  $0,5078 \pm 0,1143$  e Ureia  $53,89 \pm 10,62$  - os parâmetros já voltam ao valor basal, podendo indicar uma melhora na TFG (Figura 5).

Figura 5 - Avaliação da função renal pela dosagem de creatinina e ureia.



Avaliação da função renal pela da dosagem de creatinina (mg/dL) e ureia (mg/dL) no soro dos animais do grupo controle (Sham) (n=10), e nos grupos que passaram pelo modelo de CH com diferentes tempos de recuperação após insulto, sendo eles: 2 h (n=10), 6 h (n=10) e 24 h (n=10). Valores representados pela média  $\pm$  desvio padrão, considerando \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  (ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey).

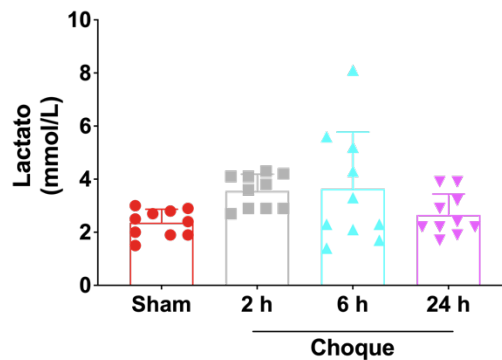
Um estudo realizado em 2018, demonstrou um aumento significativo da creatinina e ureia séricas em animais após 6 h do CH. Nesse mesmo estudo, utilizando da análise histológica do rim desses animais, foi possível perceber um aumento da necrose celular, perda da borda em escova, formação de cilindros e dilatação dos túbulos renais (QI *et al.*, 2018). Corroborando a hipótese de o CH seguido de reperfusão, causar dano aos rins e a função renal. Da mesma forma WANG *et al.*, 2012 mostraram aumento desses parâmetros 2 h após o choque hemorrágico, indicando o desenvolvimento de uma disfunção renal aguda.

Na literatura encontram-se poucos estudos que avaliam a função renal após longas horas de recuperação do CH. Um estudo de 1992, que realizou um choque hemorrágico com duração de 180 min, e analisou os dados após 24 h da reperfusão, não encontrou diferença significativa no aumento de creatinina no grupo CH ( $0,75 \pm 0,1$  mg/dL) comparado ao grupo controle ( $0,6 \pm 0,02$  mg/dL), mas encontrou uma diferença significativa na ureia desses dois grupos (CH  $26,0 \pm 2,8$  e Controle  $17,0 \pm 1,0$  mg/dL)(YU; SEGURO; ROCHA, 1992). Podendo indicar uma recuperação da função renal após um período de 24 h, o que condiz com a característica de adaptabilidade e alta recuperação renal.

Outro indicador muito utilizado para avaliação da disfunção de órgãos, e da gravidade da hipoxia, é o lactato. O lactato é produzido como consequência da respiração celular anaeróbica, principalmente pelos músculos, dessa forma, a sua dosagem é usada na clínica para

avaliação de pacientes que estão passando por um quadro de hipóxia. Por mais que nos grupos de 2 h e 6 h podemos observar uma leve tendência no aumento de lactato, não foi identificado nenhuma diferença significativa entre os grupos (Figura 6).

Figura 6 - Concentração de lactato.



Avaliação da concentração de lactato (nmol/L), logo antes da eutanásia, no sangue dos animais do grupo controle (Sham) (n=10), e dos grupos que passaram pelo modelo de CH com diferentes tempos de recuperação pós insulto, sendo eles: 2 h (n=10), 6 h (n=10) e 24 h (n=10). Valores representados pela média  $\pm$  desvio padrão considerando \*p<0,05 (ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey).

O modelo de choque hemorrágico aplicado foi capaz de causar dano hepático e disfunção renal. O dano as células desses dois principais órgãos, pode indicar um dano de órgãos generalizado, levando a FMO. O provável aumento de necrose e apoptose nos tecidos pode levar a um aumento na liberação de espécies reativas de oxigênio na corrente sanguínea e também no local, podendo levar a um aumento do estresse oxidativo.

## 5.2 Estresse oxidativo

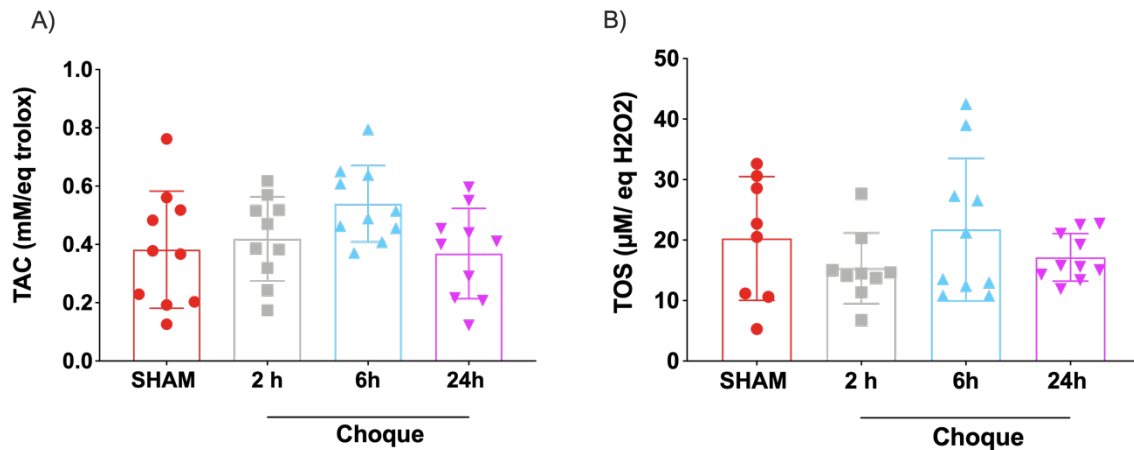
### 5.2.1 Sangue

A avaliação do estresse oxidativo pode se dar de algumas formas, utilizando da medição da concentração dos produtos formados por reações secundárias à formação de ERO, medição da atividade de enzimas antioxidantes ou por um comparativo entre essas duas formas.

A TAC é utilizada para avaliação de um panorama antioxidante geral, pois com uso desse método é medido a capacidade antioxidante de todos os elementos antioxidantes presentes na amostra. No modelo de CH utilizado no estudo, não foi observada diferença significativa entre os grupos avaliados. Da mesma forma para o TOS, que avalia o potencial oxidante das espécies presentes na amostra. Observando o gráfico da Figura 7, pode ser que exista uma

tendência de aumento tanto da TAC quanto do TOS, no grupo com 6 h de recuperação, porém não foi identificada diferença significativa para os resultados.

Figura 7 - Capacidade antioxidante total (TAC) e status oxidante total (TOS)



A) Avaliação da capacidade antioxidante total (TAC) em mM/eq trolox. B) Avaliação do status oxidante total (TOS)  $\mu\text{M}/\text{eq H}_2\text{O}_2$ ; Medidas realizadas no soro dos animais do grupo controle (Sham) (n=10), e dos grupos que passaram pelo modelo de CH com diferentes tempos de recuperação pós insulto, sendo eles: 2 h (n=10), 6 h (n=10) e 24 h (n=10). Valores representados pela média  $\pm$  desvio padrão considerando  $*p < 0,05$  (ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey).

Segundo SIES (2015), essas medições generalizadas do estresse oxidativo, como a TAC e o TOS, devem ser evitadas, pois não são capazes de refletir um estado real do organismo, sendo preferível a análise de parâmetros mais específicos como produtos de reações causadas pelas ERO e enzimas antioxidantes (POMPELLA *et al.*, 2014).

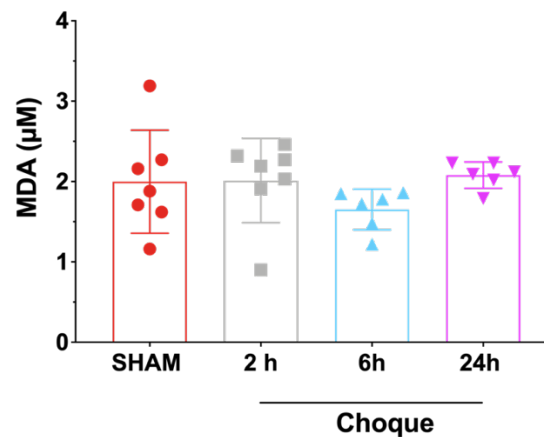
Um dos produtos de oxidação mais utilizados para avaliação do estresse oxidativo são os TBARS, ou o principal deles o MDA, que são gerados pela peroxidação lipídica causada pelo aumento de ERO decorrente do processo de I/R. Não foi identificada nenhuma diferença significativa do MDA sérico ( $\mu\text{M}$ ) entre os grupos Sham ( $1,999 \pm 0,6407$ ), 2 h ( $2,011 \pm 0,5230$ ), 6 h ( $1,652 \pm 0,2529$ ) e 24 h ( $2,080 \pm 0,1640$ ) (Figura 8).

Um estudo publicado em 2017, que realizou modelo semelhante de CH, com tempo de recuperação de 4h, avaliou MDA no soro utilizando de um kit ELISA e obteve diferença significativa ao comparar grupo controle e grupo CH, tendo um aumento na concentração de MDA no grupo CH (YANG, L.; DONG, 2017). Os métodos de análise do MDA diferem entre o estudo citado e o realizado nesse trabalho. Com a utilização do método por HPLC a

identificação do MDA se torna muito específica, dessa forma os resultados dos dois estudos são pouco comparáveis.

A maioria dos estudos que constam na literatura que avaliam o MDA em modelo de CH, utiliza métodos colorimétricos, e poucos avaliam esse parâmetro no soro, geralmente utilizam amostras do órgão de interesse para realização do teste.

Figura 8 - Produto de peroxidação lipídica, malonaldeído (MDA) plasmático.



Medida realizada em HPLC, no plasma dos animais do grupo controle (Sham) (n=7), e dos grupos que passaram pelo modelo de CH com diferentes tempos de recuperação pós insulto, sendo eles: 2 h (n=7), 6 h (n=6) e 24 h (n=6). Valores representados pela média  $\pm$  desvio padrão considerando \*p<0,05 (ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey).

Seguindo a linha de avaliação de produtos de oxidação e enzimas antioxidantes, foi avaliado o estado do complexo da glutatona no sangue, dosando GSH, GSSG, atividade da GPx e realizando uma razão entre concentração de GSH/GSSG.

As concentrações de GSH entre os grupos, por mais que possa ser observado no gráfico (Figura 9-A) uma certa tendência de diminuição nos grupos de CH, não foi comprovado diferença significativa entre os grupos. Da mesma forma não tivemos diferença significativa na atividade da GPx, observando o gráfico (Figura 9-C) ficou levemente aumentada nos grupos de 2 h e 24 h. Esse aumento inicial da GPx se deve a uma indução inicial pelo aumento da quantidade de espécies reativas, como uma tentativa de controlar e fazer a manutenção do equilíbrio. Porém com o passar do tempo, e aumento das espécies reativas a GPx começa sofrer uma regulação e diminui a sua atividade, com a percepção de diminuição de atividade e um aumento de marcadores de estresse oxidativo a expressão dessa enzima aumenta e por esse

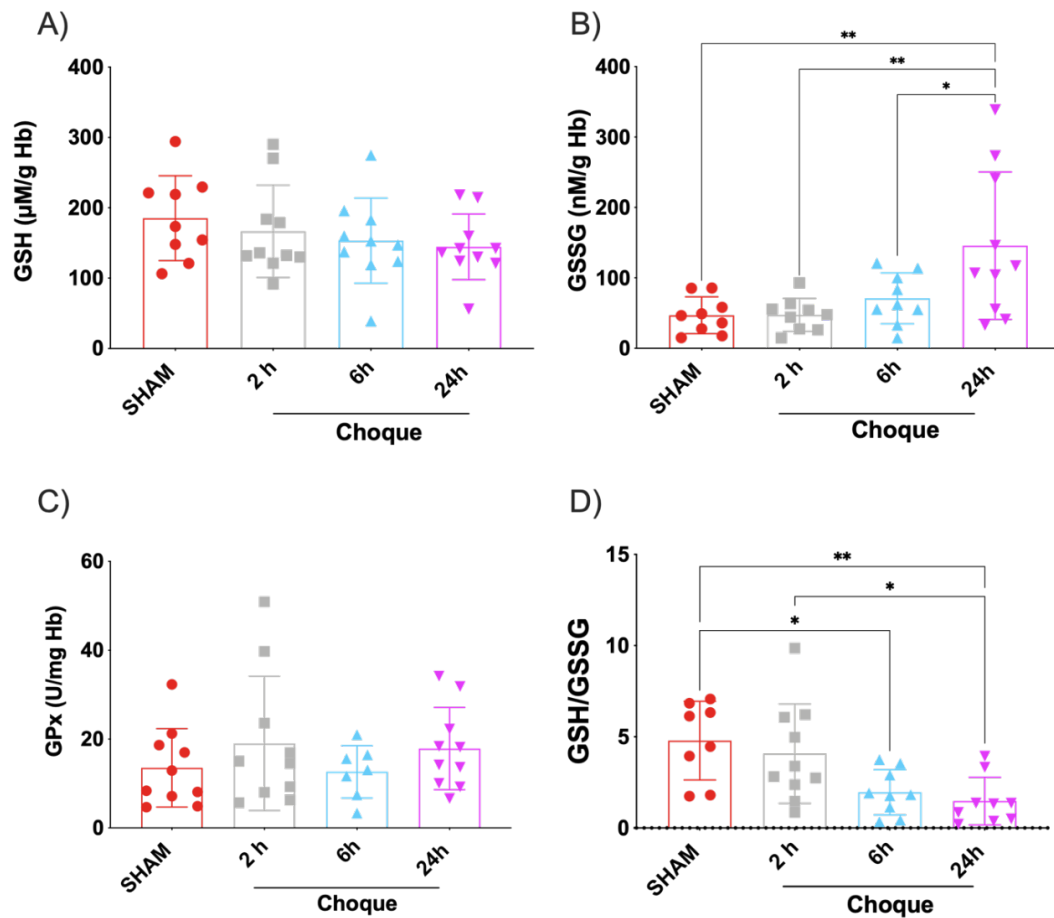


motivo no tempo de 24 h já é possível observar um aumento na sua atividade (LUSHCHAK; STOREY, 2021).

Não termos encontrado uma diminuição da GSH pode ser devido a ação da GR, na recuperação dessa molécula, não sendo possível utilizar somente esse parâmetro como marcador. Estudos já demonstraram que a suplementação dos precursores da GSH, tem potencial de diminuir o estresse oxidativo, e as consequências do dano de isquemia-reperfusão (MIYAKUNI *et al.*, 2018) demonstrando o papel fundamental do ciclo da glutathiona nesse tipo de trauma.

Como demonstrado na Figura 1, a GSH sofre oxidação através da ação da GPx, para poder eliminar as ERO, mais especificamente  $H_2O_2$ , formando GSSG. A concentração de GSSG (nM/g Hb) no grupo 24 h ( $145,6 \pm 104,6$ ) foi significativamente maior que a concentração de GSSG nos grupos Sham ( $46,78 \pm 26,14$ ), 2 h ( $47,39 \pm 23,38$ ) e 6 h ( $70,94 \pm 36,21$ ) (Figura 9-B). Esse aumento da GSSG, já indica uma piora no estresse oxidativo, e por a GSSG ter potencial citotóxico, o seu aumento gera maior dano as células, liberando mais ERO, e consequentemente consumindo mais GSH, como tentativa de restabelecer o equilíbrio.

Figura 9 - Complexo da glutaciona



Avaliação do complexo da glutaciona em sangue dos animais do grupo controle (Sham) ( $n=10$ ), e dos grupos que passaram pelo modelo de CH com diferentes tempos de recuperação pós insulto, sendo eles: 2 h ( $n=10$ ), 6 h ( $n=10$ ) e 24 h ( $n=10$ ). Valores representados pela média  $\pm$  desvio padrão, considerando  $*p<0,05$ ,  $**p<0,01$  (ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey). A) Glutaciona reduzida (GSH); B) Glutaciona oxidada (GSSG); C) Glutaciona peroxidase (GPx); D) Razão da glutaciona reduzida com a glutaciona oxidada (GSH/GSSG).

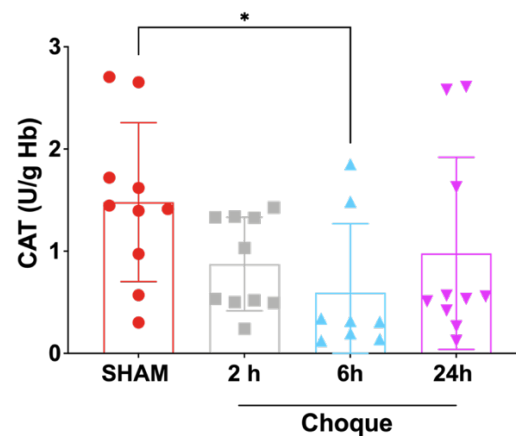
Uma boa forma de analisar o estresse oxidativo, é usando da razão GSH/GSSG que leva em consideração a quantidade de GSSG relativa a quantidade de GSH, sendo que uma razão menor, indica uma maior quantidade de GSSG, e portanto, indicando um aumento do estresse oxidativo (LU, 2013; OWEN; BUTTERFIELD, 2010).

A razão entre GSH/GSSG foi significativamente menor nos grupos 6 h e 24 h quando comparados ao grupo Sham (Figura 9-D), indicando um aumento no estresse oxidativo nesses grupos, por mais que não tenha sido possível visualizar isso nos outros marcadores.

Outro resultado que corrobora a hipótese de existir uma relação entre o aumento do estresse oxidativo e CH., é a diminuição da atividade da CAT no grupo 6 h (Figura 10). A

enzima CAT atua como antioxidante no organismo, e, portanto, a sua diminuição pode significar que ela está hiporegulada por conta do aumento da concentração de marcadores do estresse oxidativo, e dessa forma não é capaz de eliminar as ERO e diminuir o estresse oxidativo (LUSHCHAK; STOREY, 2021).

Figura 10 - Atividade da enzima antioxidante, catalase (CAT).



CAT em U/g de hemoglobina no sangue dos animais do grupo controle (Sham) (n=10), e dos grupos que passaram pelo modelo de CH com diferentes tempos de recuperação pós insulto, sendo eles: 2 h (n=10), 6 h (n=10) e 24 h (n=10). Valores representados pela média  $\pm$  desvio padrão, considerando \* $p < 0,05$  (ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey).

Em um estudo que avaliou a atividade da CAT no soro de animais que passaram por um modelo traumático de choque hemorrágico com fratura de fêmur, demonstrou também uma diminuição significativa comparada ao grupo controle do estudo (LIU *et al.*, 2021), confirmando que quando ocorre um dano, com liberação de ERO, a atividade da CAT fica diminuída.

A diminuição no tempo de 6 h muito provavelmente se deve a uma diminuição da atividade da CAT quando exposta a grandes quantidades de ERO. Porém o seu aumento em 24 h, pode ser explicado por ser considerada uma exposição crônica a essas ERO, podendo levar a uma maior expressão gênica da CAT, aumentando a quantidade disponível e consequentemente a atividade da enzima (GLORIEUX *et al.*, 2015).

Com a avaliação do estresse oxidativo no sangue confirmamos a ideia inicial de que o CH leva a um aumento do estresse oxidativo geral e com diferentes intensidades para cada tempo de recuperação. Enquanto no tempo de 2 h, mais agudo, não foi perceptível um aumento do estresse, o que pode ser explicado pelo fato de que durante esse período as enzimas e fatores

antioxidantes ainda são capazes de manter o equilíbrio. Entretanto, ao longo do tempo, as enzimas são hiporeguladas e os fatores antioxidantes são consumidos, o equilíbrio se perde e o estresse oxidativo começa a aumentar a sua intensidade.

### 5.2.2 Órgãos

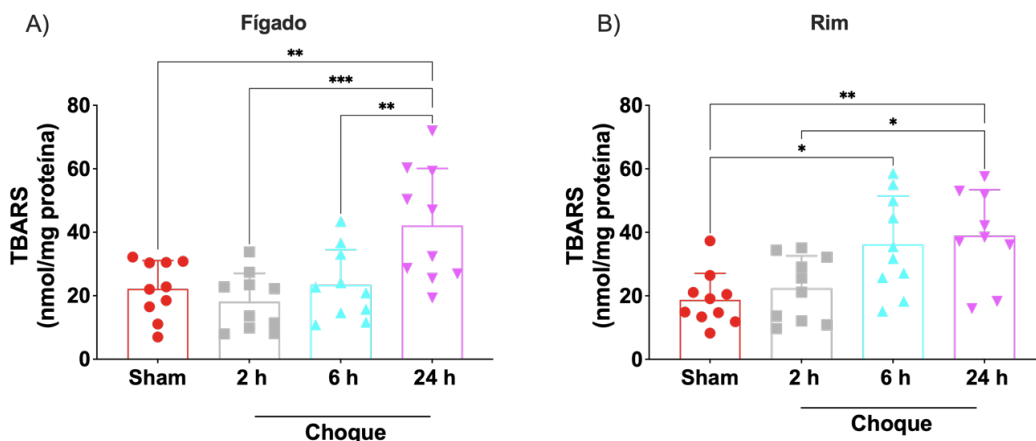
Avaliando o estresse oxidativo nos órgãos, foram realizadas 3 análises em tecido hepático e renal: dosagem de grupamentos tióis, TBARS e atividade da catalase, sendo possível analisar um fator antioxidante (SH), uma enzima antioxidante (CAT) e um marcador de peroxidação lipídica (TBARS).

Após o dano de I/R, o fígado demonstrou um aumento na concentração de TBARS no grupo de 24 h de recuperação. Já no rim, esse aumento foi significativo tanto no grupo 6 h, e no grupo de 24 h.

O aumento de TBARS indica um aumento no estresse oxidativo, por conta de um aumento da peroxidação lipídica local. Tanto o rim quanto o fígado sofreram um aumento dessa peroxidação ao longo do tempo. Esses resultados são muito similares ao que já foi visto nos marcadores de estresse oxidativo avaliados no sangue, e da mesma forma, no grupo de 2 h não foi possível notar nenhuma diferença quando comparado com o grupo Sham.

No sangue, quando avaliamos a concentração de MDA, não vimos diferença significativa, sendo esse marcador um tipo de TBARS, porém com a metodologia utilizada nos órgãos, foi avaliado a concentração não só de MDA, e sim de todos os TBARS, tendo um resultado mais expressivo dessas espécies, e consequentemente, da peroxidação lipídica.

Figura 11 – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado.



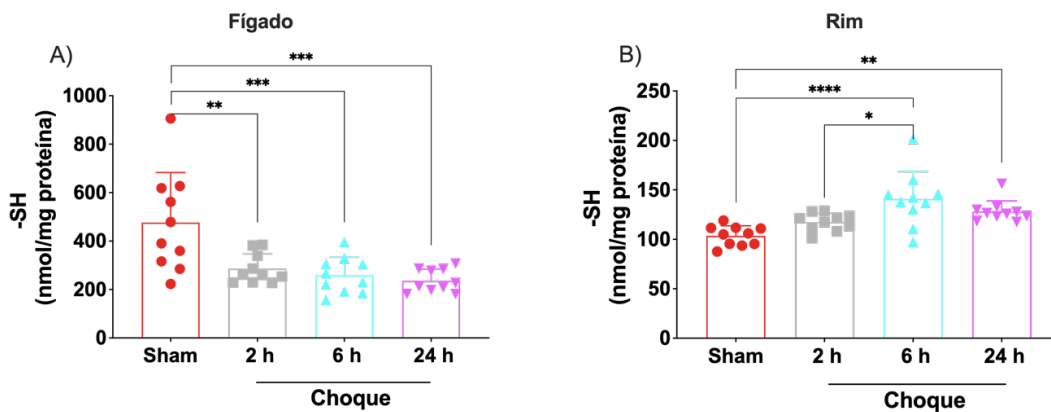
Comparação da concentração dos produtos de peroxidação lipídica, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado (Gráfico A) e no rim (Gráfico B) dos animais do grupo controle (Sham) (n=10), e dos grupos que passaram pelo modelo de CH com diferentes tempos de recuperação pós insulto, sendo eles: 2 h

(n=10), 6 h (n=10) e 24 h (n=10). Valores representados pela média  $\pm$  desvio padrão, considerando \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  (ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey).

Os grupamentos tióis no fígado demonstraram uma diminuição em todos os grupos CH, quando comparado ao grupo Sham [Sham –  $476,7 \pm 206,1$ ; 2 h –  $285,3 \pm 61,42$ ; 6 h –  $258,6 \pm 74,86$ ; 24 h –  $236,5 \pm 47,57$ ; (nmol/mg de proteína)], demonstrando um consumo desses fatores antioxidantes, o que indica um aumento do estresse oxidativo no local.

Já no rim, tivemos um resultado contrário, com um aumento dos grupamentos tióis nos grupos 6 h e 24 h (Sham –  $103,6 \pm 10,8$ ; 2 h –  $117,4 \pm 8,91$ ; 6 h –  $140,7 \pm 27,98$ ; 24 h –  $128,1 \pm 10,90$ ; (nmol/mg de proteína)).

Figura 12 - Grupos tióis (SH) no fígado e no rim

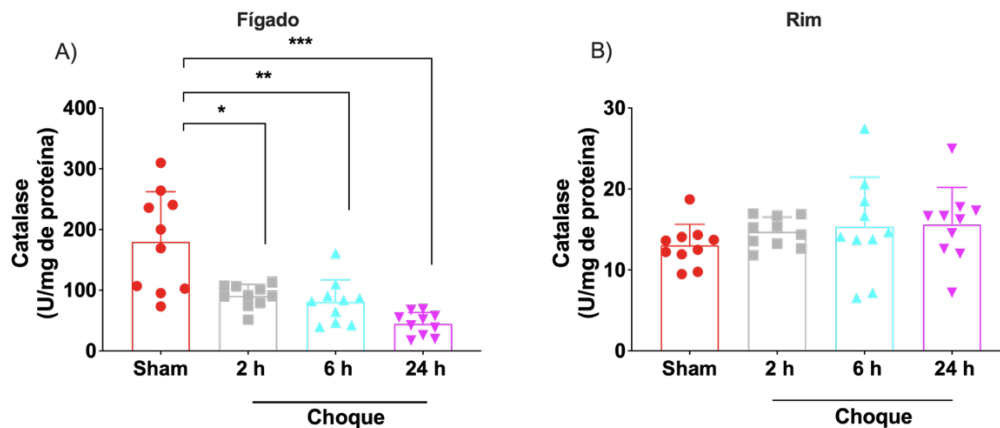


Comparação da concentração de grupos tióis (SH) no fígado (Gráfico A) e no rim (Gráfico B) dos animais do grupo controle (Sham) (n=10), e dos grupos que passaram pelo modelo de CH com diferentes tempos de recuperação pós insulto, sendo eles: 2 h (n=10), 6 h (n=10) e 24 h (n=10). Valores representados pela média  $\pm$  desvio padrão, considerando \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  (ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey).

Quando avaliamos a atividade da enzima CAT nos órgãos, tivemos o mesmo comportamento que o fator antioxidante SH, sendo possível observar uma diminuição da atividade dessa enzima no fígado, mas sem mudanças significativas no rim.

No fígado, todos os grupos CH tiveram uma diminuição da atividade da enzima, comparado ao grupo Sham (Sham –  $179,8 \pm 82,43$ ; 2 h –  $90,65 \pm 18,62$ ; 6 h –  $80,73 \pm 36,49$ ; 24 h –  $44,47 \pm 18,84$ ; (U/mg de proteína)).

Figura 13 - Comparação da atividade da enzima antioxidante, catalase (CAT) no fígado (Gráfico A) e no rim (Gráfico B)



Comparação da atividade da enzima antioxidante, catalase (CAT) no fígado (Gráfico A) e no rim (Gráfico B) dos animais do grupo controle (Sham) (n=10), e dos grupos que passaram pelo modelo de CH com diferentes tempos de recuperação pós insulto, sendo eles: 2 h (n=10), 6 h (n=10) e 24 h (n=10). Valores representados pela média  $\pm$  desvio padrão, considerando \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  (ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey).

Segundo HALLIWELL e GUTTERIDGE (1985) a atividade da catalase difere entre os órgãos, sendo predominante no fígado e nos eritrócitos. Essa diferença entre os dois órgãos mostra que a resposta ao dano de I/R ocorre de maneira diferente entre os tecidos. Enquanto o rim parece ser mais adaptável a mudanças de fluxo sanguíneo por conta de seus mecanismos compensatórios, acaba que consegue sofrer menos a falta de perfusão e oxigenação mesmo tendo menos catalase, ao contrário do fígado.

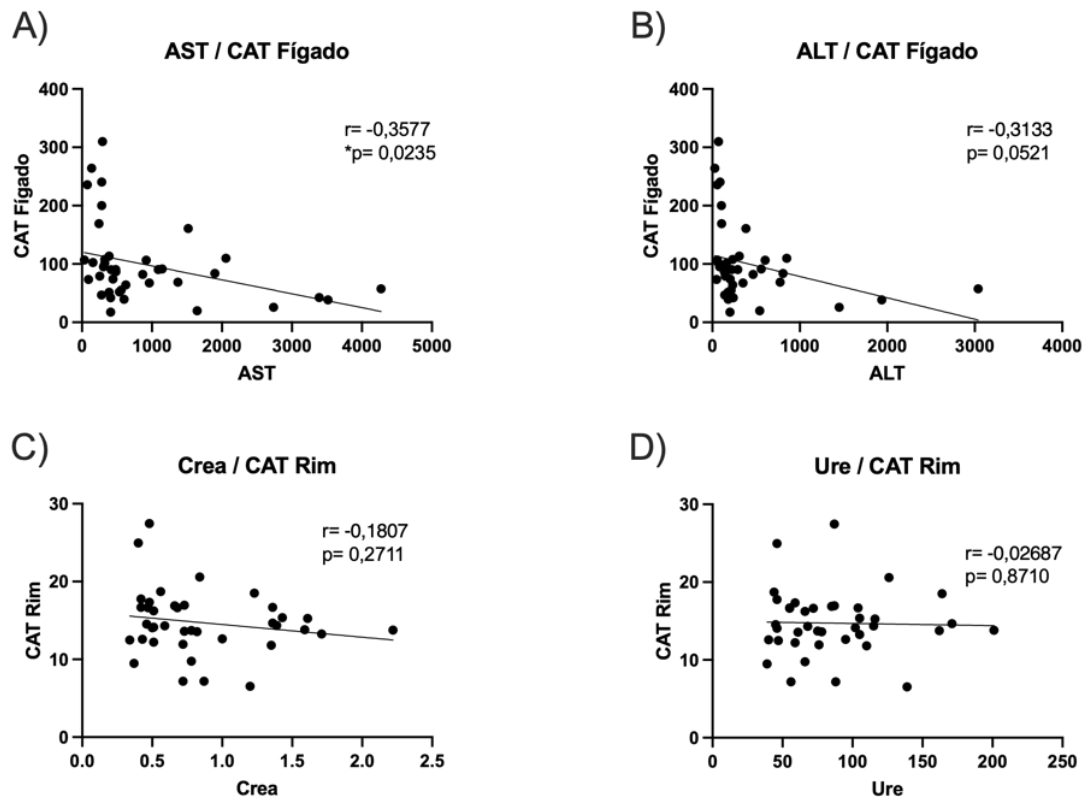
### 5.3 Correlação entre dano de órgãos e estresse oxidativo

Com a identificação de um dano hepático, disfunção renal e aumento do estresse oxidativo nos grupos que sofreram o CH, fica o questionamento da relação entre essas duas consequências do dano de I/R. Com o intuito de avaliar uma possível correlação entre o dano de órgãos e o estresse oxidativo foi realizado o teste de correlação de Pearson com alguns marcadores.

Avaliando os fatores antioxidantes, como a CAT e os grupamentos tióis com os marcadores de dano hepático, percebeu-se uma correlação negativa significativa entre o aumento da concentração de AST com a diminuição da enzima CAT ( $r = -0,357$ ; \* $p = 0,0235$ ) (Figura 14 – A). Também foi identificada uma correlação negativa significativa entre o aumento

da concentração de AST com a diminuição da concentração de grupamentos tióis no fígado ( $r = -0,3172$ ;  $*p = 0,0461$ ) (Figura 15 – A). Indicando uma relação entre o aumento do dano hepático com a diminuição da capacidade antioxidante nesse órgão.

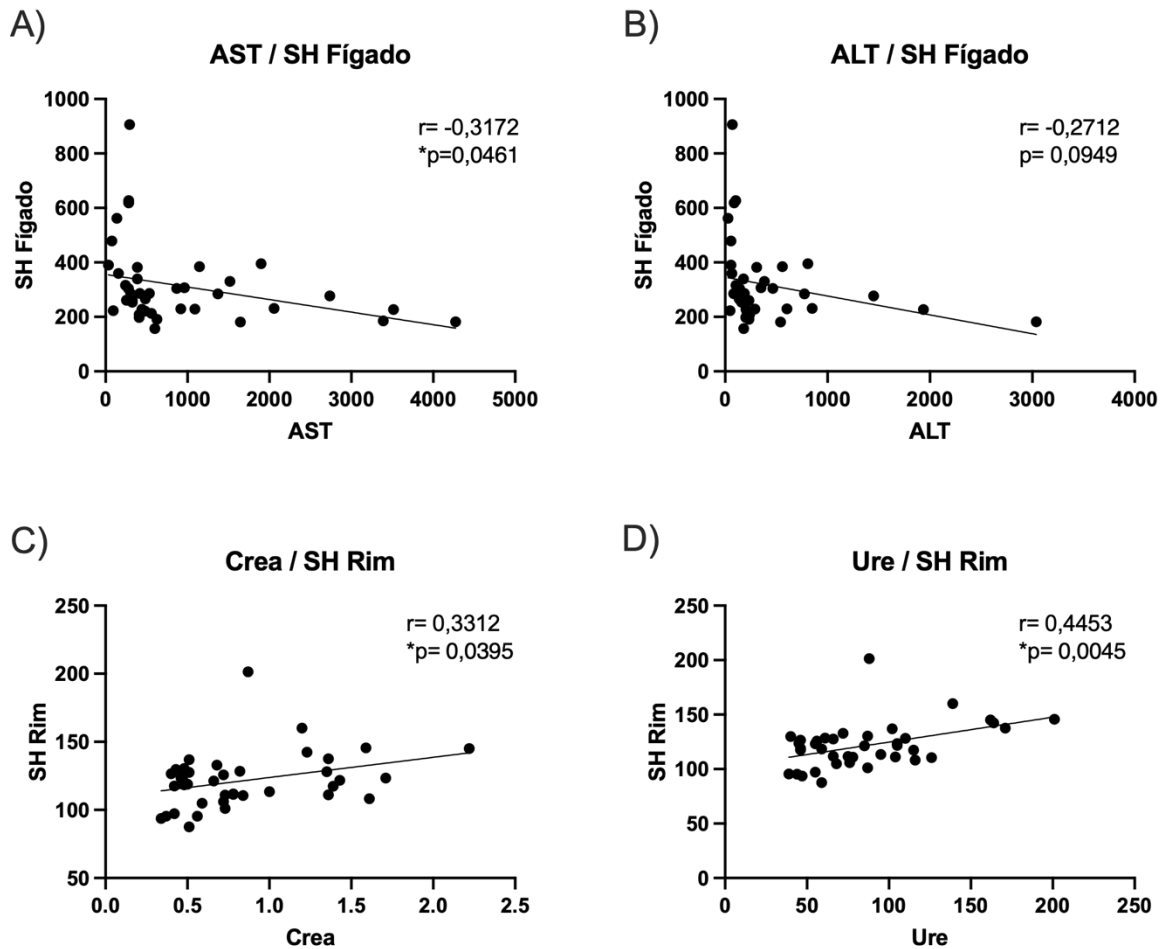
Figura 14 - Correlação da atividade da enzima antioxidante, catalase (CAT) em órgãos, com a concentração de parâmetros indicadores de dano hepático e de função renal.



Atividade da enzima catalase no Fígado (CAT Fígado); Atividade da enzima catalase no rim (CAT Rim); Aspartato aminotransferase (AST); Alanina aminotransferase (ALT); Creatinina (Crea); Ureia (Ure). Considerando  $*p < 0,05$  (Realizado teste de correlação de Pearson seguido de uma regressão linear).

No rim, não houve correlação significativa entre o aumento de marcadores de disfunção renal com a atividade de CAT nesse órgão. Porém, obtivemos uma correlação positiva, quando avaliamos a concentração de grupamentos tióis com a ureia ( $r = 0,4453$ ;  $*p = 0,0045$ ) e a creatinina ( $r = 0,3312$ ;  $*p = 0,0395$ ), ou seja, quanto maior as concentrações desses dois marcadores renais, maior também a concentração dos grupamentos tióis. Essas correlações demonstram mais uma vez a diferença de resposta antioxidante desses dois órgãos frente ao CH.

Figura 15 - Correlação da concentração de grupamentos tióis (SH) no fígado e no rim com parâmetros indicadores de dano hepático e de função renal.

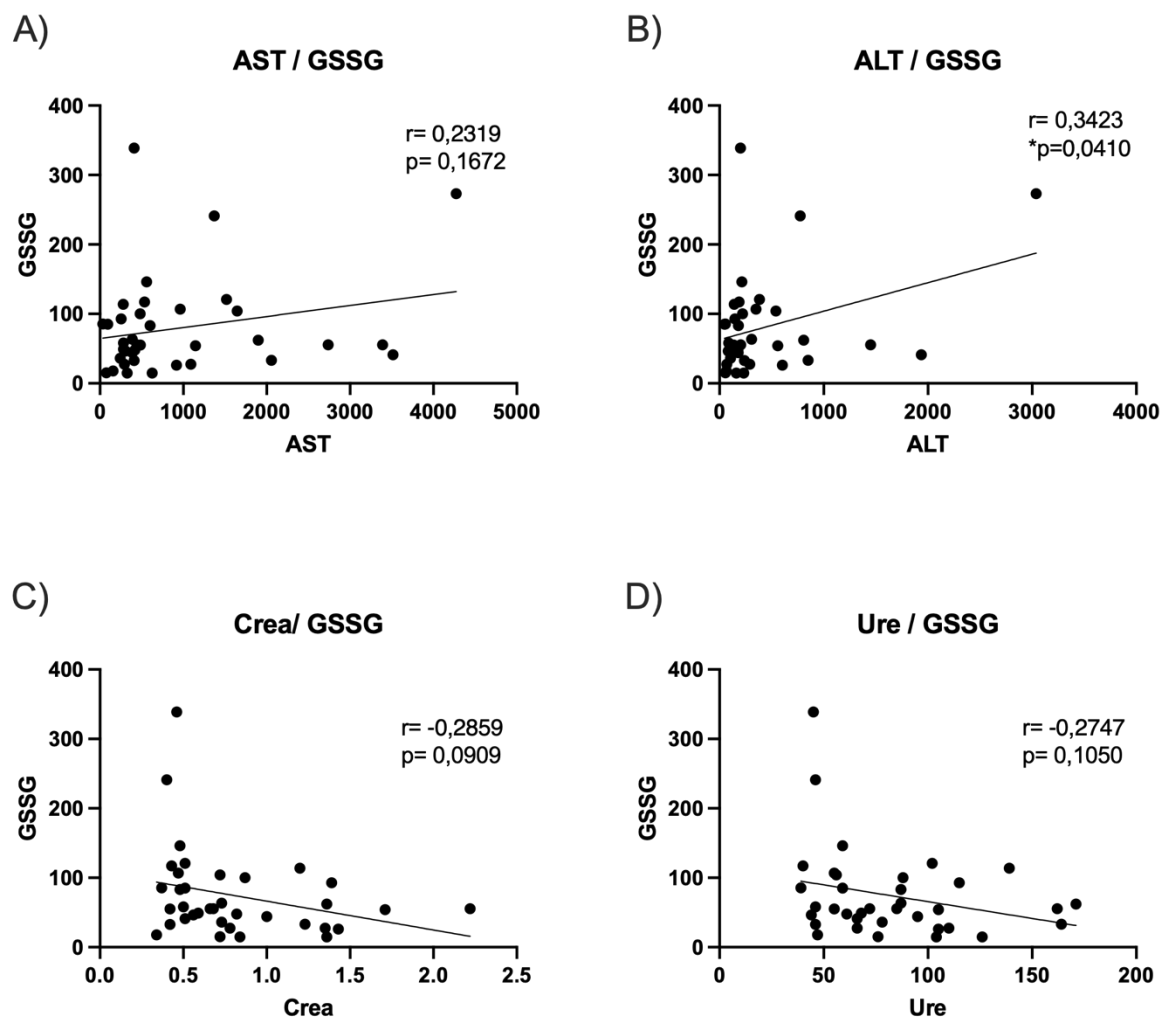


Grupamentos tióis no fígado (SH Fígado); Grupamentos tióis no rim (SH Rim); Aspartato aminotransferase (AST); Alanina aminotransferase (ALT); Creatinina (Crea); Ureia (Ure). Considerando  $*p < 0,05$  (Realizado teste de correlação de Pearson seguido de uma regressão linear).

Ao observar as correlações entre os mesmos marcadores de dano hepático e disfunção renal, agora correlacionando com a concentração de GSSG no sangue, observamos que o aumento da concentração de ALT está significativamente relacionado com o aumento da concentração de GSSG. Os outros marcadores não indicaram nenhuma correlação significativa.



Figura 16 - Correlação da concentração da glutathiona oxidada (GSSG) em sangue com parâmetros indicadores de dano hepático e de função renal.



Aspartato aminotransferase (AST); Alanina aminotransferase (ALT); Creatinina (Crea); Ureia (Ure).  
 Considerando  $*p < 0,05$  (Realizado teste de correlação de Pearson seguido de uma regressão linear).

Valores de  $r$  entre 0,3 e 0,5 indicam uma correlação fraca, já valores de  $r$  entre 0,5 e 0,7 indicam correlações moderadas, portanto, quanto mais próximo de 1 mais forte se torna a correlação (MUKAKA, 2012). Embora as correlações sejam fracas, o que podemos indicar com a análise dessas correlações é que o dano hepático parece estar relacionado com o aumento do estresse oxidativo. Já no rim, não observamos essa correlação.

De forma geral, pode existir uma correlação entre aumento dos marcadores de estresse oxidativo com a ocorrência de um dano celular. Com a realização da dosagem de ureia e creatinina é possível avaliarmos a função renal, contudo, a elevação desses marcadores não indica diretamente o grau de dano celular sofrido. Conseqüentemente, os grupos que sofreram

elevação desses marcadores desenvolveram uma disfunção renal, entretanto não podemos afirmar que ocorreu um processo de morte celular, o que pode justificar a falta de relação entre o aumento da ureia e creatinina com os marcadores de estresse oxidativo. Ao contrário do fígado, que com a elevação de AST e ALT, podemos afirmar que com o processo de I/R as células hepáticas sofreram um processo de necrose, e talvez por isso obtivemos resultados que indicam um aumento de estresse oxidativo nesse órgão.

## **6 CONCLUSÃO**

Em virtude dos fatos mencionados, foi possível confirmar de forma parcial a hipótese levantada. Pois, o modelo de CH utilizado no estudo para indução do dano de I/R, de fato levou a um dano hepático, uma disfunção renal e um aumento do estresse oxidativo de forma geral. Realizando a avaliação de diferentes tempos de recuperação, foi possível observar diferenças entre os marcadores ao longo do tempo, tendo uma piora no dano hepático quanto mais longo era o tempo de recuperação, porém não foi observado o mesmo padrão de piora no tecido renal.

A variação dos marcadores antioxidantes ao longo do tempo, pode indicar a atuação de alguns mecanismos regulatórios, como hiporegulação e indução da expressão gênica das enzimas antioxidantes com a variação da concentração de ERO, porém para confirmar a presença desses mecanismos se faz necessário a aplicação de testes mais específicos. Foi identificado que no tempo de 24 h de recuperação o dano de órgãos e o estresse oxidativo se mostraram aumentados, podendo considerar um estresse oxidativo crônico.

Houve correlação positiva entre o dano hepático e o estresse oxidativo, porém é importante lembrar que correlação não implica em causalidade, e dessa forma não podemos afirmar que um causa o outro, somente que os dois estão relacionados. Diferentemente do rim, que não foi observado correlação do estresse oxidativo e da disfunção.

Foi observado uma diferença entre os órgãos quando avaliado os parâmetros de estresse oxidativo após a indução do dano de I/R. Sendo necessário uma maior investigação da fisiopatologia do modelo de I/R nos dois órgãos separadamente, e de como funcionam as respostas ao estresse oxidativo em cada um deles. Também seria necessário um estudo histológico das estruturas, tanto renais quanto hepáticas, para avaliar de forma mais precisa e concreta o dano celular sofrido por esses órgãos ao longo do tempo de recuperação do CH.

A fisiopatologia do dano de I/R vem se estabelecendo mais fortemente com o passar do tempo, da mesma forma os estudos e olhares estão voltados para o entendimento do estresse oxidativo. A cada novo estudo as metodologias, os mecanismos regulatórios e as consequências

de cada marcador estão sendo elucidados. Dessa forma, com o melhor entendimento, será possível encontrar substâncias ativas, ou manobras para o tratamento mais eficaz e assertivo para o dano de I/R.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. [S.l.: s.n.], 1984. p. 121–126. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050163>>.

ANDERSEN, L. W. *et al.* Etiology and Therapeutic Approach to Elevated Lactate Levels. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 88, n. 10, p. 1127–1140, out. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025619613005557>>.

ANDRADE, S. S. C. DE A. *et al.* Internações hospitalares por lesões decorrentes de acidente de transporte terrestre no Brasil, 2013: permanência e gastos\*. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 26, n. 01, p. 31–38, jan. 2017. Disponível em: <[http://revista.iec.gov.br/template\\_doi\\_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742017000100031&scielo=S2237-96222017000100031](http://revista.iec.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742017000100031&scielo=S2237-96222017000100031)>.

BAUM, N.; DICHOSO, C. C.; CARLTON, C. E. Blood urea nitrogen and serum creatinine. Physiology and interpretations. *Urology*, v. 5, n. 5, p. 583–588, 1975.

BOTHA, A. J. *et al.* Early Neutrophil Sequestration after Injury: A Pathogenic Mechanism for Multiple Organ Failure. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, v. 39, n. 3, 1995. Disponível em: <[https://journals.lww.com/jtrauma/Fulltext/1995/09000/Early\\_Neutrophil\\_Sequestration\\_after\\_Injury\\_\\_A.3.aspx](https://journals.lww.com/jtrauma/Fulltext/1995/09000/Early_Neutrophil_Sequestration_after_Injury__A.3.aspx)>.

BOTSOGLU, N. A. *et al.* Effect of long-term dietary administration of Oregano on the alleviation of carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 15, p. 6287–6293, 2008.

CONTRERAS-ZENTELLA, M. L.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. Is Liver Enzyme Release Really Associated with Cell Necrosis Induced by Oxidant Stress? 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2016/3529149>>.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, v. 15, n. 4, p. 316–328, ago. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939475305001043>>.

DEWAR, D. *et al.* Postinjury multiple organ failure. *Injury*, v. 40, n. 9, p. 912–918, set. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020138309002824>>.

DOMIJAN, A. M. *et al.* Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL - application to various biological samples. *Biomedical Chromatography*, v. 29, n. 1, p. 41–46, 2015.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 82, n. 1, p. 70–77, maio 1959. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003986159900906>>.

ELTZSCHIG, H. K.; ECKLE, T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nature Medicine*, v. 17, n. 11, p. 1391–1401, 7 nov. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nm.2507>>.

EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, v. 38, n. 12, p. 1103–1111, 2005.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, v. 37, n. 4, p. 277–285, 2004.

ESIOBU, P.; CHILDS, E. W. A Rat Model of Hemorrhagic Shock for Studying

Vascular Hyperpermeability. [S.l: s.n.], 2018. p. 53–60. Disponível em: <[http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7526-6\\_5](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7526-6_5)>.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Methods in Enzymology: Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*. [S.l: s.n.], 1990. p. 407–421.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 30, n. 1–2, p. 1–12, fev. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299708000617>>.

FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I.; GALLEANO, M. In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1840, n. 2, p. 931–934, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.030>>.

GIUSTARINI, D. *et al.* Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide. *Nature Protocols*, v. 8, n. 9, p. 1660–1669, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nprot.2013.095>>.

GLORIEUX, C. *et al.* Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 87, p. 84–97, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.017>>.

GRANGER, D. N.; KVIETYS, P. R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.020>>.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Protection against oxidants in biological systems. *Free radicals in biology and medicine*. 2. ed. [S.l.]: OXFORD, 1985. p. 87.

HURT, R. T. *et al.* Hemorrhage-Induced Hepatic Injury and Hypoperfusion can be Prevented by Direct Peritoneal Resuscitation. 2009.

JOHANSSON, L. H.; HÅKAN BORG, L. A. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Analytical Biochemistry*, v. 174, n. 1, p. 331–336, 1988.

KAUVAR, D. S.; LEFERING, R.; WADE, C. E. Impact of Hemorrhage on Trauma Outcome: An Overview of Epidemiology, Clinical Presentations, and Therapeutic Considerations. *Journal of Trauma: Injury, Infection & Critical Care*, v. 60, n. 6, p. S3–S11, jun. 2006. Disponível em: <<https://journals.lww.com/00005373-200606001-00002>>.

KEW, M. C. Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. *The Lancet*, v. 355, n. 9204, p. 591–592, fev. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673699002196>>.

KLISIC, A. *et al.* Total oxidant status and oxidative stress index as indicators of increased reynolds risk score in postmenopausal women. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 24, n. 19, p. 10126–10133, 2020.

KRSTIC, D. *et al.* Biochemical Markers of Renal Function. *Current Medicinal Chemistry*, v. 23, n. 19, p. 2018–2040, 2016.

LIU, Y. *et al.* Protective Effect of Crocin on Liver Function and Survival in Rats With Traumatic Hemorrhagic Shock. *Journal of Surgical Research*, v. 261, n. 82, p. 301–309, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jss.2020.12.027>>.

LU, S. C. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General*

*Subjects*, v. 1830, n. 5, p. 3143–3153, maio 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416512002632>>.

LUEDDE, T.; KAPLOWITZ, N.; SCHWABE, R. F. Cell Death and Cell Death Responses in Liver Disease: Mechanisms and Clinical Relevance. *Gastroenterology*, v. 147, n. 4, p. 765–783.e4, out. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508514009147>>.

LUSHCHAK, V. I.; STOREY, K. B. Oxidative stress concept updated: Definitions, classifications, and regulatory pathways implicated. *EXCLI journal*, v. 20, p. 956–967, 2021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34267608>>. Acesso em: 4 maio 2022.

MATHEW, P. J. *et al.* The burden of excess length of stay in trauma patients. *The American Journal of Surgery*, v. 216, n. 5, p. 881–885, nov. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002961017316045>>.

MIRA, J. C. *et al.* Patterns of gene expression among murine models of hemorrhagic shock/trauma and sepsis. *Physiological Genomics*, v. 48, n. 2, p. 135–144, 2016.

MIYAKUNI, T. *et al.* Cystine and Theanine Improve Survival after Gut Ischemia-Reperfusion. *Annals of Nutrition and Metabolism*, v. 73, n. 2, p. 131–137, 2018. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/489825>>.

MOORE, K. *The Physiological Response to Hemorrhagic Shock*. [S.l.: s.n.], 2014. v. 40. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0099176714004140>>.

MUKAKA, M. M. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi medical journal : the journal of Medical Association of Malawi*, v. 24, n. 3, p. 69–71, set. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638278>>.

OBERT, D. *et al.* ER stress preconditioning ameliorates liver damage after hemorrhagic shock and reperfusion. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 21, n. 3, 2021.

OKORIE, O. N.; DELLINGER, P. Lactate: Biomarker and Potential Therapeutic Target. *Critical Care Clinics*, v. 27, n. 2, p. 299–326, abr. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749070410001296>>.

OWEN, J. B.; BUTTERFIELD, D. A. Measurement of Oxidized/Reduced Glutathione Ratio. [S.l.: s.n.], 2010. p. 269–277. Disponível em: <[http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-756-3\\_18](http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-756-3_18)>.

PARIHAR, A. *et al.* Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns*, v. 34, n. 1, p. 6–17, 2008.

PELLEGRINI, N. *et al.* Direct Analysis of Total Antioxidant Activity of Olive Oil and Studies on the Influence of Heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 5, p. 2532–2538, 1 maio 2001. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf001418j>>.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 97, p. 55–74, 2015.

POMPELLA, A. *et al.* The use of total antioxidant capacity as surrogate marker for food quality and its effect on health is to be discouraged. *Nutrition*, v. 30, n. 7–8, p. 791–793, jul. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900713005534>>.

QI, M. Z. *et al.* Intravenous Vitamin C attenuates hemorrhagic shock-related renal injury through the induction of SIRT1 in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 501, n. 2, p. 358–364, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.111>>.

SIES, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, v. 4, p. 180–183, 1 abr. 2015.

SIES, H. OXIDATIVE STRESS: OXIDANTS AND ANTIOXIDANTS. *Experimental Physiology*, n. December 1995, p. 369–376, 1996.

SINGER, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, v. 315, n. 8, p. 801, 23 fev. 2016. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2016.0287>>.

SORDI, R. *et al.* Inhibition of I $\kappa$ B kinase attenuates the organ injury and dysfunction associated with hemorrhagic shock. *Molecular Medicine*, v. 21, n. 4, p. 563–575, 2015.

SORDI, R. *et al.* Neuronal nitric oxide synthase is involved in vascular hyporeactivity and multiple organ dysfunction associated with hemorrhagic shock. *Shock*, v. 45, n. 5, p. 525–533, 2016.

TSUKAMOTO, T.; CHANTHAPHAVONG, R. S.; PAPE, H.-C. Current theories on the pathophysiology of multiple organ failure after trauma. *Injury*, v. 41, n. 1, p. 21–26, jan. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020138309003611>>.

WANG, Y. *et al.* Protective effect of crocetin on hemorrhagic shock-induced acute renal failure in rats. *Shock*, v. 38, n. 1, p. 63–67, jul. 2012. Disponível em: <[https://journals.lww.com/shockjournal/Fulltext/2012/07000/Protective\\_Effect\\_of\\_Crocetin\\_on\\_Hemorrhagic.11.aspx](https://journals.lww.com/shockjournal/Fulltext/2012/07000/Protective_Effect_of_Crocetin_on_Hemorrhagic.11.aspx)>. Acesso em: 12 jun. 2022.

WENDEL, A. Glutathione Peroxidase. *Methods in Enzymology*, v. 77, n. C, p. 325–333, 1981.

WHEELER, C. R. *et al.* Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Analytical Biochemistry*, v. 184, n. 2, p. 193–199, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Injuries and violence*. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/injuries-and-violence>>.

WU, M.-Y. *et al.* Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 46, n. 4, p. 1650–1667, 2018. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/489241>>.

YANG, L.; DONG, X. Crocin attenuates hemorrhagic shock-induced oxidative stress and organ injuries in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 52, p. 177–182, 2017.

YANG, Q.-S. *et al.* Kaempferol pretreatment modulates systemic inflammation and oxidative stress following hemorrhagic shock in mice. *Chinese Medicine*, v. 10, n. 1, p. 6, 21 dez. 2015. Disponível em: <<https://cmjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13020-015-0035-z>>.

YU, L.; SEGURO, A. C.; ROCHA, A. S. Acute renal failure following hemorrhagic shock: Protective and aggravating factors. *Renal Failure*, v. 14, n. 1, p. 49–55, 1992.