

Alterações das Concentrações de MDA Durante o Choque Séptico e Efeitos de Tratamentos Antioxidantes

Changes in MDA Concentrations During Septic Shock and Effects of Antioxidant Treatments

Kauana Neves Zuri¹, Daniele Hummel Moreira¹, Aniceto Poli¹, Lucas Cezar Pinheiro¹

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Farmacologia, Florianópolis, SC, Brasil.

Resumo

A sepse é uma síndrome definida por um foco infeccioso que desencadeia respostas pró-inflamatórias e alterações significativas em diversos sistemas. Compreende-se que a sepse produz excessivamente espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como o óxido nítrico (NO), cuja alta reatividade desta espécie leva à modificações estruturais e funcionais de proteínas, resultando em uma intensa vasodilatação sistêmica, caracterizada pela hiporreatividade vascular à agentes vasopressores. A hipotensão persistente, pressão arterial média ≤ 65 mmHg e hiperlactatecemia caracterizam a evolução do quadro ao choque séptico. Uma consequência direta do estresse oxidativo na sepse é a peroxidação lipídica, um dano às membranas celulares impulsionado por espécies altamente reativas, como o peroxinitrito. Esse processo agrava o dano tecidual ao gerar produtos tóxicos, sendo o malondialdeído (MDA), o principal marcador utilizado para quantificar a extensão dessa lesão celular. Dessa forma, foi avaliado o impacto da sepse através do aumento de MDA e o efeito de tratamentos agudos com antioxidantes. Foram utilizadas duas metodologias para a quantificação de malondialdeído, TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) e HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), a fim de comparar a sensibilidade e a especificidade, além de evidenciar particularidades relacionadas às amostras avaliadas. Para tanto, foram utilizados camundongos C57BL/6j, cuja sepse foi induzida por ligação cecal seguida de punção (CLP). Posteriormente, os animais sépticos foram tratados com drogas antioxidantes para avaliar se seria possível reverter o dano de estresse oxidativo agudamente. A sepse provoca estresse oxidativo de forma diferente em cada órgão: o dano foi significativo no coração e fígado, mas não nas hemácias. Os tratamentos antioxidantes, ascorbato e tempol foram eficazes na redução de níveis de MDA nas hemácias, coração e fígado. Os resultados obtidos por diferentes metodologias para as concentrações de MDA demonstraram alta correlação e especificidade.

Palavras-chaves: estresse oxidativo; malondialdeído; choque séptico; HPLC; TBARS; especificidade.

Key-words: oxidative stress; malondialdehyde; septic shock; HPLC; TBARS; specificity.

1. INTRODUÇÃO

A sepse é uma síndrome cuja definição foi muito debatida desde seus primeiros registros. A última revisão de conceitos ocorreu durante o Terceiro Consenso Internacional de Definição da Sepse, realizado durante os anos de 2014 e 2015, pela *European Society of Intensive Care Medicine e Society of Critical Care Medicine*, estabelecendo que a sepse é caracterizada por um foco infeccioso que desencadeia tanto respostas pró-inflamatórias, quanto alterações significativas em vias não imunológicas, incluindo as cardiovasculares, metabólicas, hormonais, neuronais, bioenergéticas e de coagulação (Singer, 2016).

Essa redefinição foi importante, visto que enfatizou a disfunção orgânica como o componente relevante na sepse, e não apenas uma resposta inflamatória sistêmica, tornando-a distinguível de uma infecção complicada e buscando unificar a linguagem científica e clínica para facilitar diagnósticos mais precisos e estudos comparáveis (Singer, 2016). No Brasil, a sepse é responsável por cerca de 400 mil casos registrados anualmente em adultos, sendo que 240 mil evoluem para o óbito, representando uma taxa de mortalidade de 60%; entre crianças o índice corresponde a 19%, com 8 mil mortes em 42 mil casos (Ministério da Saúde, 2023).

O diagnóstico da sepse é estabelecido na presença de infecção, acompanhada de dois ou mais pontos na pontuação SOFA (do inglês, Avaliação Sequencial de Insuficiência de Órgãos), que corresponde a uma ferramenta utilizada para diagnosticar, estadiar e caracterizar clinicamente o estado de gravidade em que o paciente se encontra, variando de 0 a 4. Clinicamente, o quadro é acompanhado por duas ou mais das seguintes manifestações: temperatura corporal $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$, frequência cardíaca > 90 bpm, frequência respiratória > 20 rpm, - caracterizando taquipnéia -, em complemento, o quadro caracteriza-se juntamente com a contagem de leucócitos $> 12.000/\text{mm}^3$ ou $< 4.000/\text{mm}^3$. Quando a pressão arterial média está ≤ 65 mmHg, mesmo com o uso de agentes vasopressores e ocorre hiperlactatemia (≥ 2 mmol/L, ou ≥ 18 mg/dL), ambas caracterizam o estágio mais grave da sepse: o choque séptico.

Tal estágio é descrito como um subconjunto de sepse em que ocorrem anomalias metabólicas, circulatórias e celulares profundas, estando associadas ao maior risco de mortalidade, e nas quais, clinicamente, destaca-se a hipotensão persistente (Singer, 2016). É através da análise de anormalidade em resultados laboratoriais e clínicos que a pontuação SOFA é elaborada; portanto, uma pontuação mais alta indica maior disfunção orgânica, e sua progressão está associada a uma maior probabilidade de mortalidade. Dessa forma, atualmente a sepse é compreendida como uma resposta inflamatória exacerbada do organismo à uma infecção sistêmica, sendo esta associada à disfunção de órgãos, representando, assim, uma condição de ameaça à vida (Zabet, 2016; Singer, 2016).

1.1. FISIOPATOLOGIA

A resposta inflamatória exacerbada desencadeia uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), que participam da tentativa de eliminação dos patógenos pelo organismo. Fisiologicamente, essas espécies reativas atuam como moléculas sinalizadoras essenciais, modulando processos celulares e respostas adaptativas no contexto da homeostase oxidativa (Feelisch *et al.*, 2022; Sies, 2020). A figura 1 mostra a diferença entre o eustresse e o estresse oxidativo. Em situações de homeostase, as espécies reativas de oxigênio (ROS) sofrem baixa exposição, levando a respostas fisiológicas que ocorrem num organismo saudável. Já o estresse ocorre sob alta exposição, atingindo alvos inespecíficos que levam à interrupção de sinalização redox, gerando uma resposta patológica. O tipo de estresse gerado influencia nas respostas adaptativas, como fator nuclear kappa B (NF- κ B), fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) e fator induzido por hipóxia (HIF), levando à produção ou redução de disfunções locais ou sistêmicas.

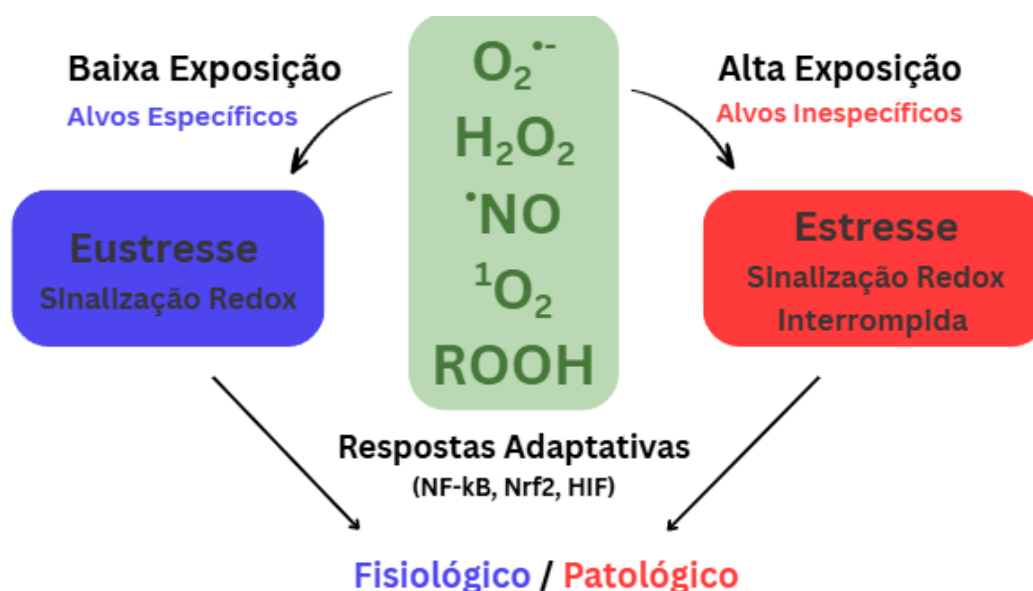


Figura 1: Diferenças entre eustresse e estresse. O tipo de estresse e alvos atingidos modula a resposta do organismo, levando à produção ou redução de disfunções locais ou sistêmicas. *Adaptado de Sies, 2020.*

Paralelamente ao aumento das ROS, a sepse também é caracterizada por uma profunda alteração na via do óxido nítrico (NO). O NO é um radical livre sintetizado pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS) (Staerck *et al.*, 2017); e em condições fisiológicas, o NO desempenha papéis cruciais na modulação do tônus vascular, na inibição da agregação plaquetária, adesão de neutrófilos, e na resposta imune contra patógenos (Tousoulis *et al.*, 2012; Rosselli *et al.*, 1998; Gkaliagkousi *et al.*, 2011; Chello *et al.*, 1998). Existem diferentes isoformas de NOS: a NOS neuronal (nNOS ou NOS 1), a NOS induzível (iNOS ou NOS 2) e a NOS endotelial (eNOS ou NOS 3) (Knowles *et al.*, 1994; Cinelli *et al.*, 2019).

Durante a sepse, a expressão da iNOS é estimulada em diversas células, incluindo os macrófagos e os neutrófilos. Esta isoforma de NOS é capaz de produzir quantidades de NO centenas a milhares de vezes maiores que as isoformas constitutivas, como a nNOS e a eNOS (Webber *et. al.*,2019). A alta biodisponibilidade de NO leva a S-nitrosilação de proteínas gerando modificações estruturais e funcionais destas proteínas, sendo uma importante via na hiporesponsividade vascular, presente no choque séptico (Nozik-Grayck *et. al.*,2006). O aumento na biodisponibilidade de NO é, portanto, um fator de relevância na instabilidade hemodinâmica e na progressão da disfunção orgânica (Alencar *et. al.*,2002).

Paralelamente ao estresse oxidativo decorrente da sepse ocorre a peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, presentes nas membranas celulares. Esse processo é impulsionado por espécies altamente reativas, como o peroxinitrito, proveniente da união entre uma molécula de óxido nítrico e um ânion superóxido, culminando na peroxidação lipídica. Em consequência, resulta na intensificação da liberação de malondialdeído e de outros produtos tóxicos (Pacher *et. al.*, 2007), agravando o dano tecidual. A figura 2 exemplifica o processo no qual as ROS têm como alvo as proteínas, o DNA e os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS). Os PUFAS, sob influência das ROS, levam ao início do estresse oxidativo através da peroxidação lipídica, que conseqüentemente, ocasiona a síntese de produtos altamente reativos e tóxicos, como 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), F2 isoprostanes (F2-isoPs) e o marcador malondialdeído. Em grande escala, a cascata abaixo leva ao aumento do dano tecidual.

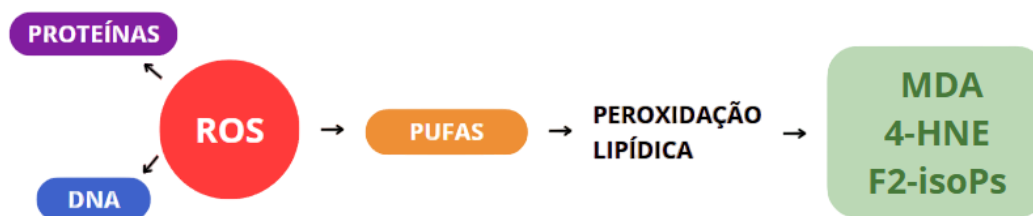


Figura 2: Esquema exemplificando o ataque aos alvos de ROS em: proteínas, DNA e PUFAS. Sob influência das ROS, as PUFAS levam ao início do estresse oxidativo através da peroxidação lipídica. Conseqüentemente, ocasiona a síntese de produtos altamente reativos e tóxicos, como o malondialdeído (MDA); tal cascata em grande escala, leva ao aumento do dano tecidual. *Adaptado de Tsikas, 2017.*

Considerando a participação do estresse oxidativo e nitrosativo na fisiopatologia da sepse e na formação de MDA, diversas abordagens terapêuticas com antioxidantes têm sido investigadas. Neste estudo, foram utilizados o ascorbato (Armour *et. al.*, 2001; Wu, Wilson, 2003), a glutatona (GSH) (Fernandes *et. al.*, 2012) e o tempol (Kim *et. al.*, 2009; Liaw *et. al.*, 2005).

Dentre esses agentes, o ascorbato, um potente antioxidante, tem demonstrado capacidade de modular o estresse oxidativo e a disfunção microvascular em modelos de sepse, possivelmente através da inibição da iNOS (Wu *et. al.*, 2003; Armour *et. al.*, 2001; Benedet, 2017). A glutatona (GSH) é o principal antioxidante tiol intracelular, e desempenha um papel crucial na defesa

celular contra o estresse oxidativo. Tais ações ocorrem, possivelmente, pela competição com tióis livres vasculares (Kim *et. al.*, 2009). Adicionalmente, a GSH possui ação anti-inflamatória, caracterizada pela capacidade de inibir a síntese de diversas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, bem como a produção e resposta de interleucinas como IL-2 (Villa *et. al.*, 2002).

A fim de amplificar os mecanismos de ação dos antioxidantes já citados, optou-se pelo tempol, um mimético da enzima superóxido dismutase (SOD), que compõe a primeira linha de defesa do organismo contra as ROS, atuando como um captador do ânions superóxido, moléculas altamente reativas, liberando peróxido de hidrogênio e água (Kim *et. al.*, 2009). Não se sabe ao certo os mecanismos de ação do tempol, no entanto, apresenta maior permeabilidade à membrana e menor toxicidade em comparação à enzima SOD sintética, configurando-o como um agente promissor para o estudo; com a eliminação direta do superóxido avalia-se de forma mais direcionada o impacto da neutralização desta espécie reativa nas alterações hemodinâmicas e no dano tecidual, oferecendo um contraponto aos agentes com ação antioxidante.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do ascorbato, da glutathiona e do tempol na peroxidação lipídica, através da quantificação de malondialdeído por TBARS e HPLC, em amostras de hemácias, coração e fígado de animais controle e sépticos.

	Ascorbato	Glutathiona (GSH)	Tempol
Características	<ul style="list-style-type: none"> • modular o estresse oxidativo • reverte disfunção microvascular 	<ul style="list-style-type: none"> • defesa celular contra o estresse oxidativo • ação anti-inflamatória 	<ul style="list-style-type: none"> • mimetiza o SOD • captor de ânions superóxido
Mecanismo de ação	<ul style="list-style-type: none"> • inibição da iNOS • neutralização de S-nitrosotióis 	<ul style="list-style-type: none"> • competição com tióis livres vasculares • inibe a síntese de citocinas e quimiocinas (IL-2) 	<ul style="list-style-type: none"> • elimina diretamente o superóxido • denitrosilante

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MODELO ANIMAL E PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

O estudo utilizou amostras biológicas de camundongos C57BL/6j machos, previamente coletadas no desenvolvimento do projeto: Nitrosilação proteica: um mecanismo crítico e alvo farmacológico na sepse grave, do professor Lucas Cezar Pinheiro aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, com o número 5871200522, em 2022. Assim, não foi realizada nenhuma interação com animais neste estudo, apenas foram utilizadas amostras previamente processadas. Os animais utilizados neste projeto foram fornecidos pelo Laboratório de Farmacologia

Experimental (LAFEX), do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os camundongos eram submetidos a ciclo de claro e escuro de 12 horas cada, iniciando às 7:00. A temperatura ambiente foi mantida em $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, os animais eram agrupados de 2 a 4 por caixa plástica, possuíam livre acesso a comida e água, além de terem recebido enriquecimento ambiental.

As amostras utilizadas neste trabalho foram obtidas por meio do seguinte protocolo experimental: Os animais foram previamente tratados com tramadol 20mg/kg s.c, para analgesia e 30 minutos após iniciou-se a anestesia dos camundongos, utilizando cetamina e xilazina, 100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente (Benjamin, Ferreira, Cunha, 2000). Em seguida, foi realizada a inserção de uma cânula na veia, para administração do tratamento, e outra na artéria femoral, para aferir a pressão. Tais inserções ocorreram através de um pequeno corte na região inguinal, posteriormente as cânulas foram exteriorizadas no dorso do animal (Rees, D. D. *et. al.* 2009), para que a pressão dos animais pudesse ser avaliada.

Em sequência, os animais dos grupos CLP, tiveram a sepse induzida através do modelo de CLP (Wichterman, Baue *et al.* 1980; Torres-Duenas, Celes *et al.* 2009), que consistiu na dupla perfuração do ceco com uma agulha 40 x 1,20 mm 18G e extravasamento de fezes na cavidade abdominal, após sua exposição através de incisão realizada na região lateral esquerda do abdome.

Em razão de proporcionar uma melhor recuperação, após a cirurgia os animais ficaram sob manta térmica aquecida e receberam 1mL de solução fisiológica 0,9% aquecida através da via subcutânea para auxiliar no restabelecimento da temperatura corporal basal e reposição hidroeletrólítica. Após 10 horas dos procedimentos cirúrgicos, os animais recuperados da anestesia e com o quadro de choque séptico instaurado tiveram seus parâmetros hemodinâmicos avaliados. Aos animais pertencentes aos grupos tratados, a administração do tratamento foi realizada por via intravenosa, nas seguintes doses: ascorbato 200 mg/kg (Wu, Wilson, Tymi, 2003) , glutathiona 200 mg/kg (Kim *et. al.*, 2009) e tempol 200 mg/kg (Kim *et. al.*, 2009).

A figura 3 exemplifica o procedimento experimental. Por meio da cânula presente na artéria femoral, foram realizadas as avaliações hemodinâmicas, uma vez que o mesmo estava conectado a um transdutor de pressão, conectado ao equipamento PowerLab 4/30 ML866 (AD INSTRUMENTS, Australia). Em seguida, os animais foram eutanasiados com sobredose de cetamina e xilazina, 300 mg/kg (BRASIL-CONCEA, 2018) e 30 mg/kg (BRASIL-CONCEA, 2018) respectivamente, por via intraperitoneal. Por fim, foram colhidos diversas amostras, como coração, fígado, aorta e sangue total. Para este projeto, foram utilizadas somente as amostras de fígado, coração e hemácias.

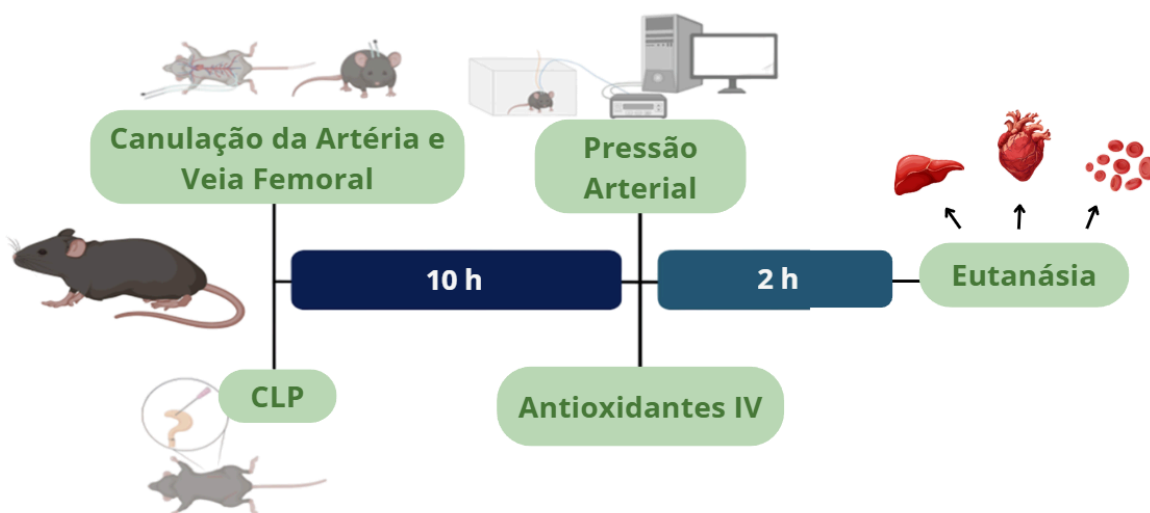


Figura 3: Esquema do procedimento experimental com os animais. Adaptado de Moreira, 2024.

2.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada utilizando o teste Shapiro-Wilk. Os dados serão apresentados com a média \pm o erro padrão da média. Foi utilizada a ANOVA de uma via com teste de *post hoc* de Dunnett, sendo considerada diferença significativa de valores de $P \leq 0,05$. Adicionalmente, foi utilizada a correlação de Pearson para avaliar o grau de associação entre os resultados obtidos pelos métodos TBARS e HPLC. Por fim, uma curva foi construída para analisar a correlação entre os níveis de MDA e a pressão arterial basal dos animais.

2.3. QUANTIFICAÇÃO DE MDA POR TBARS

O ensaio de TBARS é o método mais comum na quantificação de MDA, e trata-se de uma técnica espectrofotométrica por fluorescência simples e de baixo custo. O procedimento envolve o uso de condições ácidas e altas temperaturas, que promovem a reação entre uma molécula de MDA com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA). Essa interação forma um pigmento de coloração rosa/avermelhada, cuja intensidade é medida por leitura espectrofotométrica, permitindo quantificar o MDA gerado durante o processo de oxidação (Tsikas, 2017; Kosugi & Kikugawa, 1985). Apesar de sua alta sensibilidade na escala nanomolecular (Carbonneau *et. al.*, 1991), o método TBARS possui baixa especificidade, isso devido a reatividade do TBA com grupos carbonila de diversas moléculas reativas presentes na amostra. Assim, estes compostos interferem na análise e podem levar a uma superestimação da quantidade real de MDA (Tsikas, 2017).

O experimento ocorreu por meio da metodologia previamente descrita na literatura (Tsikas, 2017; Kosugi & Kikugawa, 1985), na qual as amostras foram solubilizadas em uma solução de ácido tiobarbitúrico (0,6mMol/L), ácido acético, e dodecil sulfato de sódio (8%P/V); seguido de banho-maria a 95°C por 1 hora, seguido de centrifugação a 10000g e leitura de fluorescência do sobrenadante com excitação de 515 nm e emissão de 553 nm, no aparelho TECAN (leitor de microplacas multimodal de fluorescência).

2.4. QUANTIFICAÇÃO DE MDA POR HPLC

A separação cromatográfica permite eliminar os resultados falso-positivos que podem estar presentes no ensaio TBARS. Corresponde, assim, a uma metodologia de alta sensibilidade, especificidade, precisão e reprodutibilidade na análise de biomarcadores de estresse oxidativo (Mateos, *et. al.* 2005).

A quantificação do total de MDA por HPLC foi realizada conforme previamente descrito na literatura “Um novo método de HPLC para a medição de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Uma comparação com um kit comercialmente disponível” (Seljeskog *et al.*, 2006), juntamente com adaptações necessárias para que melhor ocorresse a padronização da metodologia do experimento. Inicialmente, as amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato e, seguidamente, reagiram com o ácido tiobarbitúrico, com incubação a 95°C por 1 hora. Após o aquecimento, foi realizada a primeira intervenção com o propósito de otimizar a leitura no aparelho; assim, foi adicionado 0,5 mL de N-butanol em cada amostra, a fim de garantir o mínimo de proteína presente na alíquota. Seguidamente as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos. Para análise, uma alíquota de 50µL do sobrenadante foi injetada no sistema cromatográfico HPLC Waters AllianceBio e2796, equipado com bomba quaternária e detector de fluorescência. A detecção do analito foi monitorada com comprimentos de onda de excitação em 515 nm e de emissão 550 nm.

A separação cromatográfica foi conduzida em coluna de fase reversa C18 Altech Econosphaera (5 µm, 150 mm comprimento x 4,6 mm diâmetro), utilizando uma fase móvel composta por fosfato de potássio, metanol e acetonitrila (72:17:11, v/v). A concentração de MDA nas amostras foi determinada por curva padrão previamente estabelecida.

3. RESULTADOS

Foi realizada a padronização da avaliação de MDA por HPLC por fluorescência. A figura 4 indica as análises da padronização da curva padrão (apenas TBA; 25nM; 50 nM; 100 nM; 500 nM; 1000 nM), com tempo de retenção de aproximadamente 3 minutos, valor próximo ao encontrado no artigo utilizado como referência (Seljeskog, *et. al.*, 2006). Enquanto as figuras 5 e 6 demonstram a avaliação da reprodutibilidade da curva padrão em dois dias diferentes, bem como a degradação da fluorescência do MDA-TBA, a fim de permitir a análise por maiores períodos após a reação.

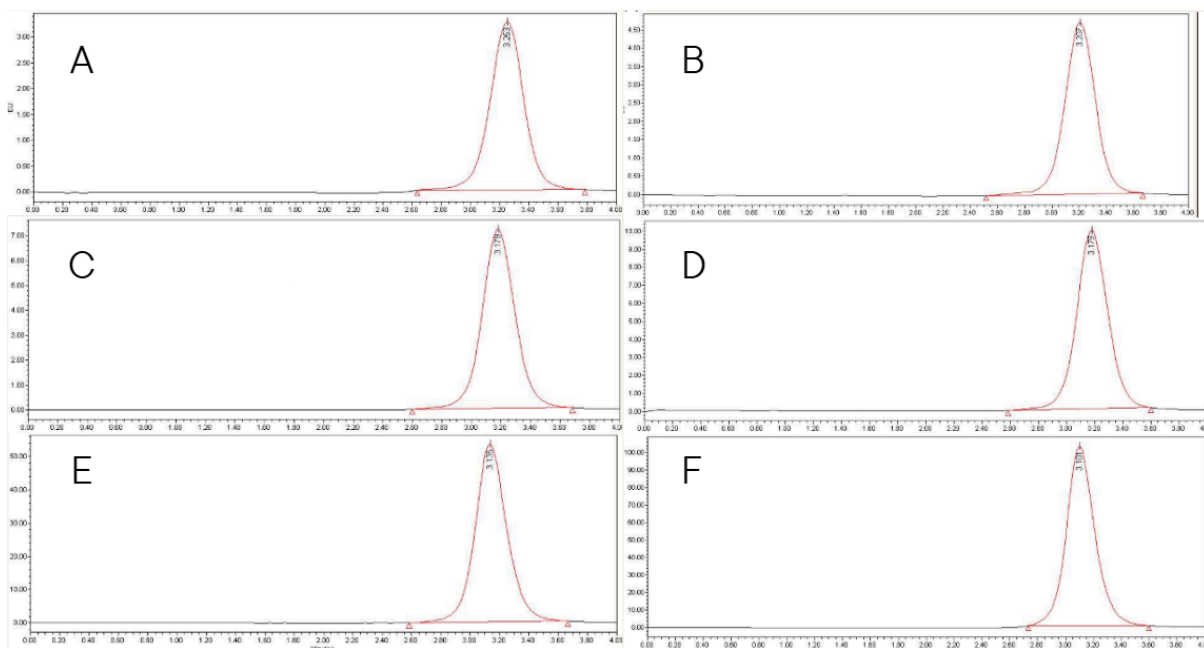


Figura 4: Padronização da curva padrão de MDA no HPLC: A) apenas TBA; B) 25nM; C) 50 nM; D) 100 nM; E) 500 nM; F) 1000 nM.

Curva Padrão Dia 1		
Concentrações nmolar	Área	Área-basal
0	246679	0
25	574545	327866
50	673454	426775
100	2040172	1793493
500	8583860	8337181
1000	14619181	14372502

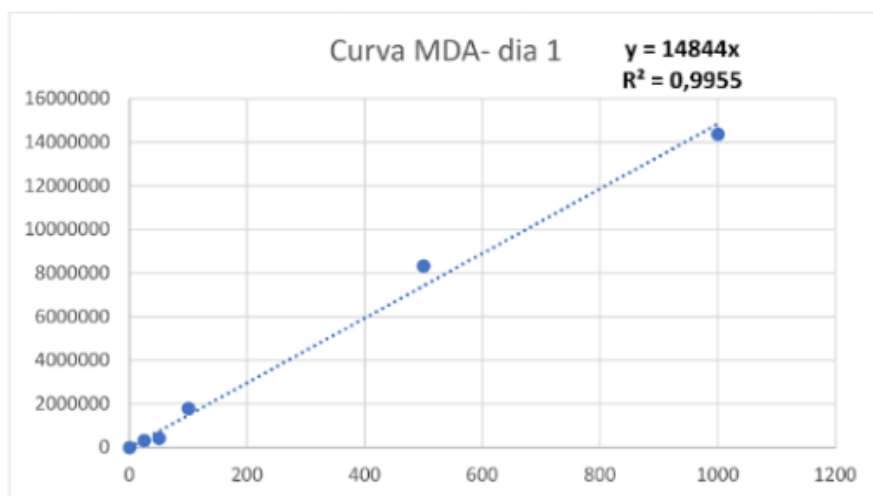


Figura 5: Curva padrão de MDA no HPLC, produzida no dia 1.

Curva Padrão Dia 2		
Concentrações nmolar	Área	Área-basal
0	532191	0
25	750966	218775
50	1129446	597255
100	1552649	1020458
500	8175019	7642828
1000	14790560	14258369



Figura 6: Curva padrão de MDA no HPLC, produzida no dia 2.

3.1. QUANTIFICAÇÃO DE MDA TECIDUAL

A quantificação de dano tecidual foi avaliada nos grupos controle, CLP e tratado, e mensurada pelos níveis de malondialdeído (MDA) presente nas hemácias e nos tecidos hepático e cardíaco.

3.1.1. Hemácias

A avaliação feita por TBARS permitiu a observação, na figura 7, de um aumento na quantidade de MDA no grupo CLP, porém não foi significativo quando comparado ao grupo controle. Contudo, ao comparar o grupo controle com os grupos tratados, o ascorbato e o tempol resultaram em uma redução significativa na concentração de MDA. Ainda, o grupo CLP comparado aos grupos tempol e ascorbato demonstraram uma diferença significativa.

Devido à intercorrências com o equipamento, não foi possível realizar a análise na metodologia de HPLC.

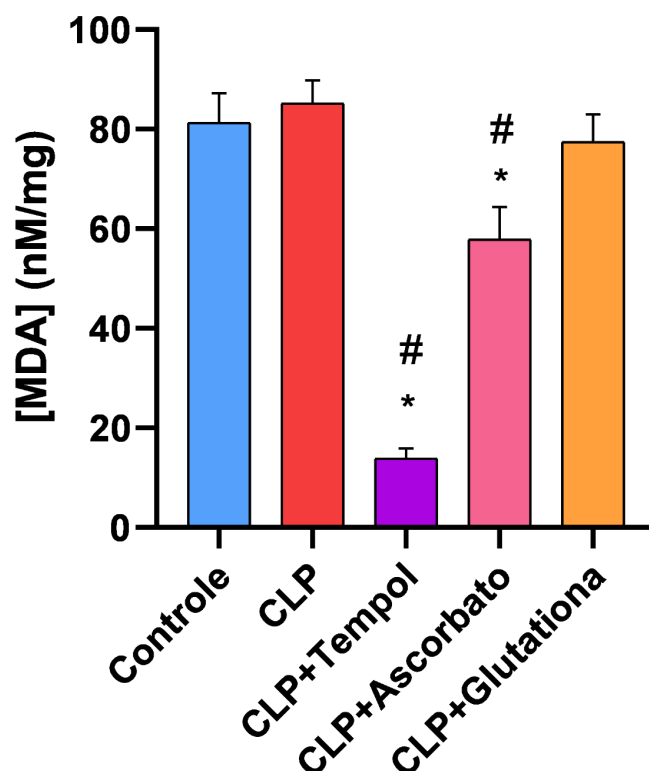


Figura 7: Resultados da concentração de MDA em amostras de hemácias, método de TBARS. A análise realizada foi ANOVA de uma via com teste de *post hoc* de Dunnett ($n = 6 - 8$). Os dados são apresentados com média \pm erro padrão da média * $P \leq 0,05$ para comparação com grupo controle e # $P \leq 0,05$ em comparação ao grupo séptico.

3.1.2. Coração

Durante a análise por TBARS, no coração (Figura 8) observou-se um aumento significativo na quantidade de MDA do grupo CLP quando comparado ao grupo controle. Já em relação aos grupos que receberam tratamento, observa-se que os grupos ascorbato, tempol e glutaciona não apresentaram diferenças significativas em seus níveis de MDA em relação ao grupo controle ou CLP. O que sugere um possível efeito antioxidante agudo (em 2 horas) após o tratamento com estas drogas. Já na análise realizada por HPLC (Figura 8), nota-se que os grupos CLP e os tratados, ascorbato, tempol e glutaciona, não demonstram diferenças significativas entre si. Nota-se diferença significativa na concentração de MDA entre os grupos controle e CLP. Novamente sugerindo um possível efeito antioxidante dos tratamentos sobre o grupo CLP.

Ao comparar os resultados dos dois métodos de quantificação de MDA no coração (Figura 8), observou-se uma pequena divergência nos achados referentes aos grupos tratados. Enquanto a análise por TBARS sugeriu um pequeno aumento significativo de MDA pelos tratamentos de tempol e de glutaciona quando comparados ao grupo controle, e redução em relação ao grupo CLP, a análise por HPLC não corroborou com estes achados. Pelo método padrão-ouro, HPLC, nenhum dos grupos tratados apresentou diferença estatisticamente significativa nos níveis de MDA quando comparados diretamente ao grupo CLP ou controle.

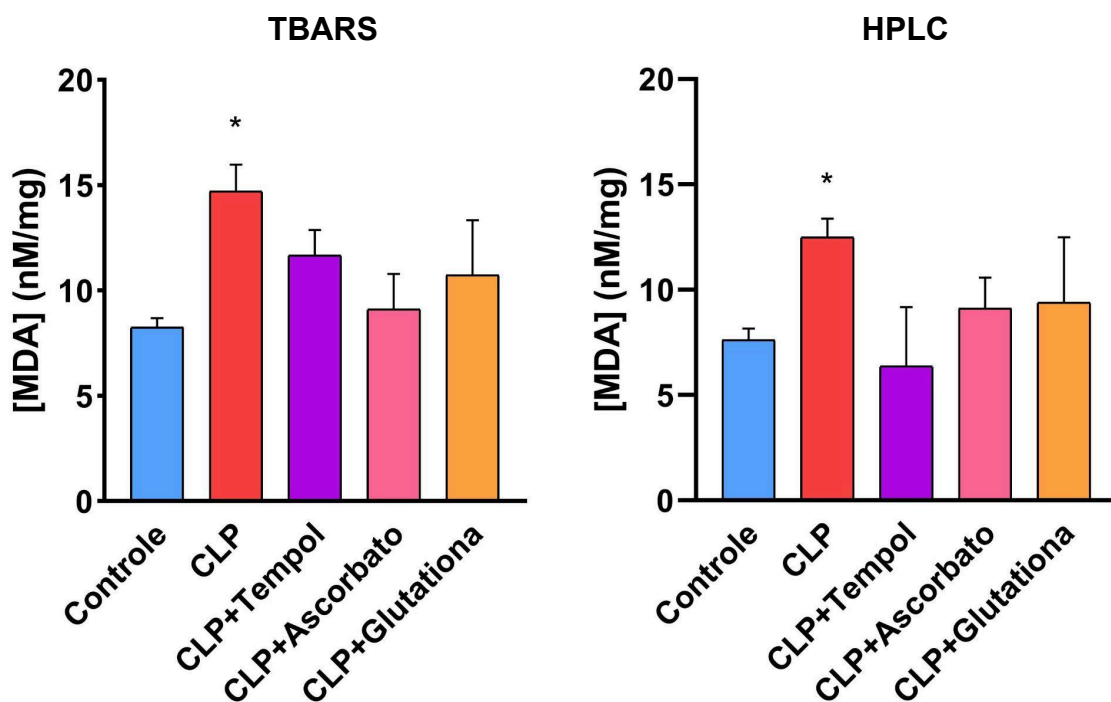


Figura 8: Concentrações de MDA no coração medidas por TBARS e por HPLC. A análise realizada foi ANOVA de uma via com teste de *post hoc* de Dunnett (n = 7 - 8). Os dados são apresentados com média \pm erro padrão da média * $P \leq 0,05$ para comparação com grupo controle.

Os níveis de MDA são comparados nas duas metodologias, HPLC e TBARS, obteve-se a correlação ilustrada na figura 9. A correlação de Pearson demonstrou uma correlação positiva ($R = 0,94$; Slope = 0,1,1) entre a mensuração pelos dois métodos. Sugerindo que os valores obtidos em cada metodologia são muito próximos, sugerindo que o TBARS avalia basicamente MDA, com pouca interferência de outros compostos.

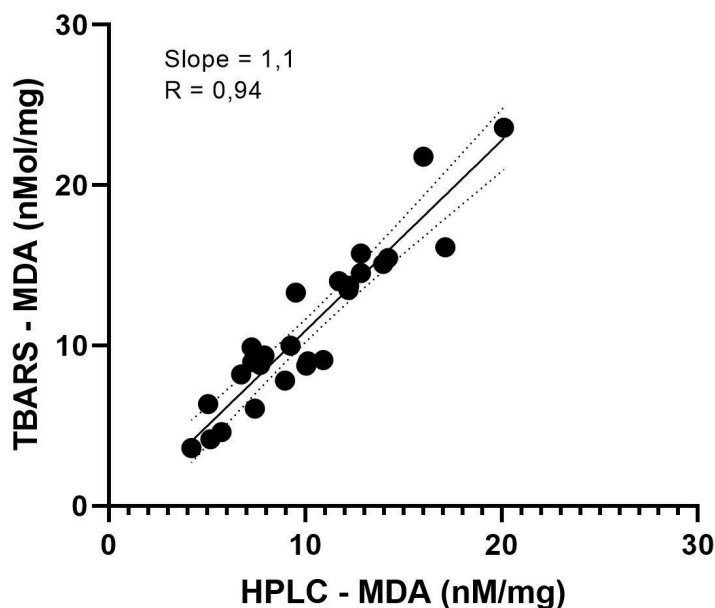


Figura 9: Correlação entre níveis de MDA no coração medido pelas duas técnicas. A análise realizada foi ANOVA de uma via com teste de *post hoc* de Dunnett ($n = 29$). Os dados são apresentados com média \pm erro padrão da média.

3.1.3. Fígado

Na figura 10 observa-se que a metodologia de TBARS possibilitou a visualização de diferenças significativas nos níveis de concentração da molécula de MDA entre os grupos controle e CLP. Aparentemente o tratamento não apresentou diferença significativa do CLP ou do grupo controle. Tais dados sugerem que o tratamento reduziu o dano de estresse oxidativo após o CLP, impedindo o aumento de MDA ou reduzindo o mesmo, considerando que foi um tratamento agudo. Na análise realizada por HPLC (Figura 10), observa-se que os grupos apresentam o mesmo perfil de comportamento: os grupos controle e tratamento; No entanto não foram observadas diferenças estatisticamente significativas .

Durante a comparação dos resultados entre as duas metodologias na quantificação de MDA no fígado (Figura 10), é observado uma pequena divergência nas concentrações encontradas, porém mantém uma análise semelhante de proporção entre as duas metodologias. Observa-se que o grupo CLP é o grupo que, em ambas metodologias, apresenta maior concentração de MDA, seguido do grupo controle.

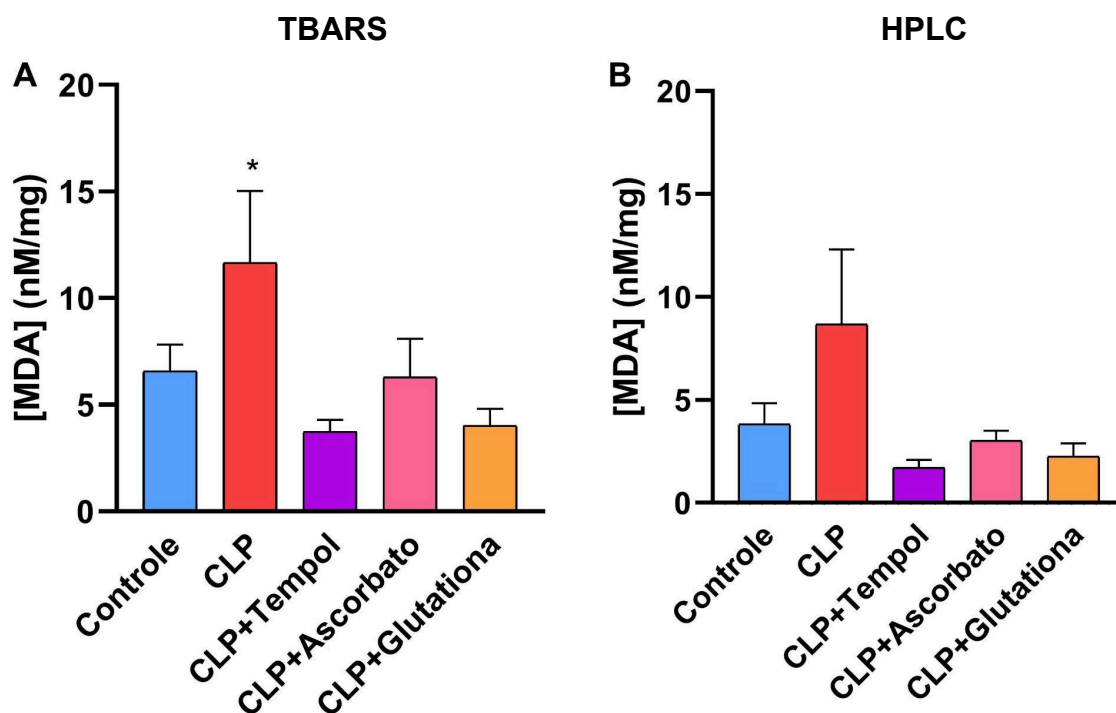


Figura 10: Concentrações de MDA no fígado medidas por TBARS e por HPLC. A análise realizada foi ANOVA de uma via com teste de *post hoc* de Dunnett (n = 7 - 8). Os dados são apresentados com média ± erro padrão da média * $P \leq 0,05$ para comparação com grupo controle.

Os níveis de MDA são comparados nas duas metodologias, HPLC e TBARS, obteve-se a correlação ilustrada na figura 11. A correlação de Pearson demonstrou uma correlação positiva forte ($R = 0,93$; Slope = 0,96) entre os níveis de MDA quantificados por HPLC e TBARS no tecido hepático. Sugerindo baixa interferência de outros compostos na análise de TBARS, e demonstrando uma boa correlação entre os resultados obtidos entre as técnicas.

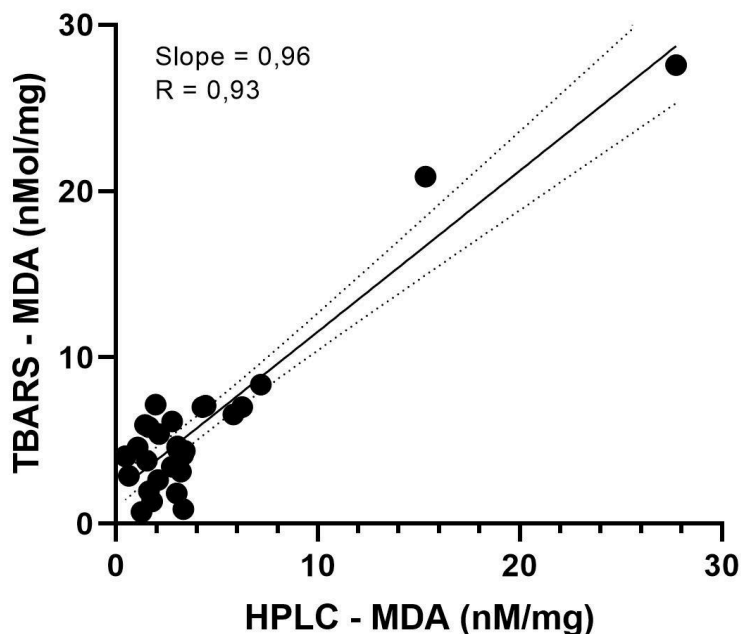


Figura 11: Correlação entre níveis de MDA no fígado medido pelas duas técnicas. A análise realizada foi ANOVA de uma via com teste de *post hoc* de Dunnett (n = 31). Os dados são apresentados com média \pm erro padrão da média.

3.2 CORRELAÇÃO ENTRE PRESSÃO E AMOSTRAS

3.2.1 Coração

Na figura 12, observa-se a correlação entre os níveis de MDA e a pressão arterial basal dos animais. Os pontos pertencentes ao grupo controle, pontos azuis, estão correlacionados a pressão arterial mais elevada e o menor valor de concentrações de MDA, enquanto os pontos correspondentes ao grupo CLP, pontos vermelhos, são caracterizados por valores mais altos de MDA e pressão arterial mais baixa. O valor de $R = 0,775$ corrobora com a correlação entre pressão arterial e níveis de MDA.

3.2.2 Fígado

Ao observar o gráfico referente ao tecido hepático (Figura 12), infere-se a inexistência de uma correlação entre pressão arterial e quantidade de MDA, visto que os pontos referentes ao grupo CLP e ao controle estão, em sua maioria, juntos. O valor de $R = 0,18$ corrobora esse achado. Ambos grupos caracterizam-se por níveis baixos de MDA e pressão variável: o grupo controle apresenta prevalência de

seus pontos com pressão mais elevada, enquanto o grupo séptico em maior parte manifesta menor pressão. Tais dados sugerem que não existe uma correlação direta entre os níveis de MDA hepáticos e a pressão arterial no contexto dos animais sépticos que analisamos.

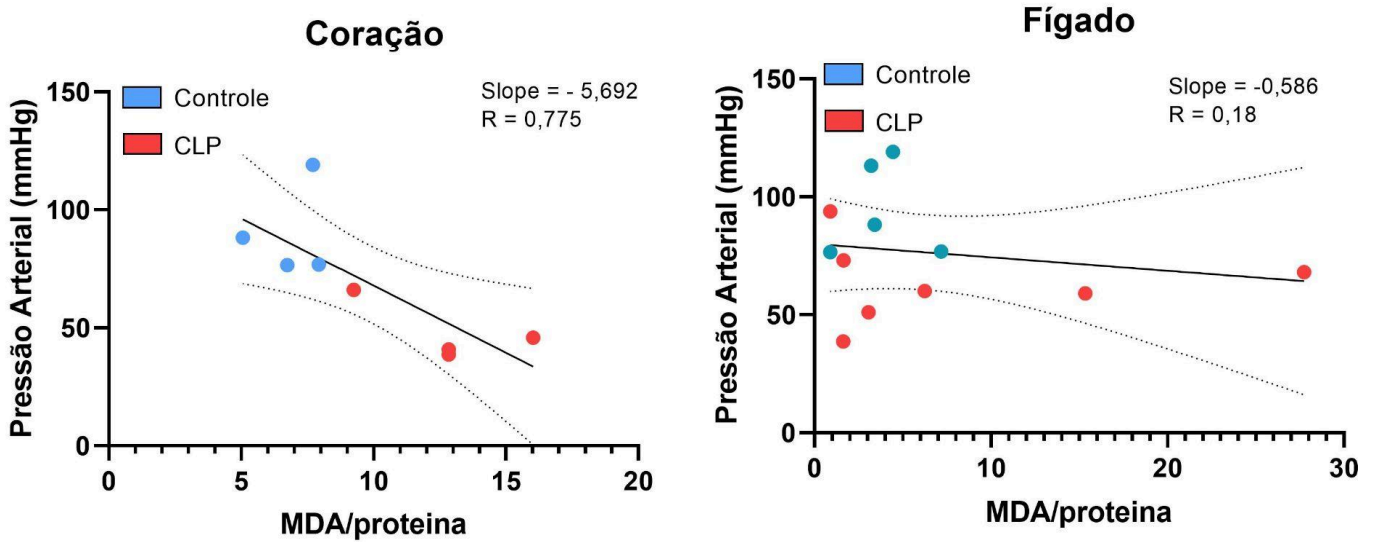


Figura 12: Correlação entre níveis de MDA e pressão arterial. A análise realizada foi ANOVA de uma via com teste de *post hoc* de Dunnett (coração: n controle = 7; n CLP = 6 / fígado: n controle = 5; n CLP = 8). Os dados são apresentados com média \pm erro padrão da média.

4. DISCUSSÃO

Os principais achados deste trabalho foram: 1 - o tratamento agudo com antioxidantes reduziram a concentração (ou impediram aumento) de MDA no fígado, hemácia e coração. 2 - Conforme ampla literatura, a indução de sepse resultou em aumento das concentrações de MDA nos tecidos analisados, no entanto não foi verificado aumento de MDA nas hemácias. 3 - A comparação entre as técnicas de medida de MDA, TBARS e HPLC mostrou altíssima correlação entre ambas, sugerindo que a seletividade do TBARS, quando avaliado por fluorescência, é alta, indicando que o produto medido é MDA em sua imensa maioria. Neste contexto, a principal diferença entre as técnicas utilizadas é a sensibilidade para quantificação de baixas concentrações de MDA.

Os dados obtidos através das duas metodologias corroboram que o choque séptico desencadeia um quadro severo de estresse oxidativo, cujas manifestações à sensibilidade aos antioxidantes e respostas teciduais responderam de formas distintas. As concentrações de MDA quantificadas neste estudo sugerem que os antioxidantes, mesmo usados agudamente, são capazes de diminuir o estresse oxidativo, aqui medido por MDA. De forma mais minuciosa, na análise das hemácias por TBARS (Figura 7), observou-se o aumento não significativo de MDA no grupo CLP, quando comparado ao controle, possivelmente indicando que a peroxidação lipídica pode não ter sido presente nesta amostra durante as 12 horas de experimento, ou que os mecanismos de defesa antioxidante intrínsecos dos eritrócitos foram suficientes para conter o dano inicial. No entanto, houve redução significativa de MDA nos grupos tratados com ascorbato e tempol, sugerindo um efeito protetor nas hemácias. A ausência de resposta no grupo tratado com glutathione (GSH) pode ser explicada devido a baixa permeabilidade à membrana celular, de forma que pode não ter sido eficientemente internalizada pelas hemácias. Em contrapartida, moléculas menores como o ascorbato e o tempol apresentam maior capacidade de ultrapassar a membrana plasmática, o que explicaria sua maior eficácia em reduzir os marcadores de dano oxidativo diretamente no ambiente intracelular.

No tecido cardíaco e hepático, a análise por TBARS e por HPLC (Figura 8 e 10) revelaram um aumento significativo de MDA no grupo CLP, o que já era esperado em modelos de choque séptico. Já os grupos ascorbato, tempol e glutathione não apresentaram diferenças significativas em seus níveis de MDA em relação ao controle ou CLP, sugerindo que tais tratamentos foram capazes de atuar sobre o dano oxidativo no tecido cardíaco, reduzindo as concentrações de MDA esperadas para o grupo CLP. Em conjunto, estes dados corroboram os dados prévios obtidos por Moreira, D.H 2024, no qual ocorreu aumento de MDA após a indução por CLP e o tratamento com tempol foi eficaz para reduzir a concentração do mesmo.

A validação cruzada entre as metodologias HPLC e TBARS confirmou a robustez dos dados: apesar das diferenças de sensibilidade e especificidade de

cada técnica, não avaliadas de forma plena neste trabalho, ambas revelaram o mesmo perfil de resposta biológica. A análise da comparação de resultados de quantificação de MDA cardíaco (Figura 9) e hepático (Figura 11) demonstrou uma correlação positiva significativa entre a concentração de MDA mensurada por HPLC e TBARS. Tais dados demonstram maior relação que outros presentes na literatura (Tsikas, 2017; Seljeskog *et al.*, 2006)

Assim, metodologias utilizadas neste estudo apresentaram resultados com altíssima correlação entre si. Ambas as técnicas foram capazes de detectar alterações no perfil oxidativo de cada amostra analisada, sendo possível observar uma correlação positiva entre os resultados, no qual o método de TBARS acompanhou o perfil dos dois tecidos quando comparado ao padrão ouro. Embora o ensaio TBARS apresente-se como uma ferramenta acessível financeiramente e facilmente aplicável, pode apresentar interferências, mas, conforme dados aqui apresentados, pode ser um técnica que a interferência é muito menor que o esperado, gerando resultados com elevada especificidade para MDA. Por outro lado, o HPLC oferece sensibilidade e especificidade através da cromatografia de alta eficiência, caracterizando sua leitura como padrão-ouro, no entanto, sua implementação torna-se limitada devido ao alto custo e complexidade da técnica.

Por fim, o gráfico de correlação de Pearson (Figura 12), que utiliza da associação entre o dano oxidativo tecidual e a pressão arterial, demonstrou uma correlação positiva forte ($R = 0,77$; Slope = $-5,6$) entre os níveis de MDA quantificados por HPLC e por pressão arterial no tecido cardíaco. Infere-se que os animais que apresentam maiores concentrações de MDA tendem a apresentar valores menores de pressão arterial, sugerindo uma relação direta entre a intensidade do estresse oxidativo causado pela peroxidação lipídica, e a alteração da pressão arterial. No entanto, tal correlação não ocorreu no fígado, ao observar o gráfico referente ao tecido hepático (Figura 12). Infere-se a inexistência de uma correlação entre pressão arterial e quantidade de MDA, visto que os pontos referentes ao grupo CLP e ao controle estão, em sua maioria, juntos. O valor de $R = 0,18$ corrobora esse achado.

5. CONCLUSÃO

A indução de sepse por CLP resultou em aumento de estresse oxidativo no fígado e coração, quantificado através do MDA. O tratamento com antioxidantes, agudamente, reduziu o MDA nestes tecidos. As técnicas de quantificação de MDA, TBARS e quantificação via HPLC foram igualmente eficazes em quantificar e apresentaram alta correlação.

6. REFERÊNCIAS

ALENCAR, J. L. et al. Role of S-Nitrosation of Cysteine Residues in Long-Lasting Inhibitory Effect of Nitric Oxide on Arterial Tone. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics - MOLECULAR PHARMACOLOGY, Volume 63, n 5, , 2002. Disponível em: <<http://molpharm.aspetjournals.org>>. Acesso em: 16/05/2025.

ARMOUR, J. et al. Ascorbate prevents microvascular dysfunction in the skeletal muscle of the septic rat. Journal of Applied Physiology, Volume 90:3, p. 795-803, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.3.795>>. Acesso em: 03/06/2025.

BENEDET, P. O. S-Nitrosilação de proteínas na sepse: proposta de um novo alvo terapêutico. Tese de Pós Graduação em Farmacologia UFSC. Repositório Institucional UFSC.2017. Disponível em <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/182731>>. Acesso em: 22/05/2025.

BENJAMIN, C. F.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. d. Q. Role os nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. The Journal of Infectious Diseases, Volume 182, Issue 1, p. 214–223, 2000. Disponível em <<https://doi.org/10.1086/315682>>. Acesso em: 20/05/2025.

CARBONNEAU, M.A. et al. Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. Clinical Chemistry, Volume 37, No.8, p. 1423–1429, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/clinchem/37.8.1423>>. Acesso em: 12/06/2025.

CINELLI, M. A. et al. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. Medicinal Research Reviews. John Wiley and Sons Periodicals Inc. 2019. doi:10.1002/med.21599 . Acesso em: 17/05/2025.

CONCEA. BRASIL. Diretriz de prática de eutanásia do CONCEA. Disponível em <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_CONCEA_n_37_de_15022018.html> . Acesso em: 14/02/25.

CHELLO, M. et al. Nitric Oxide Inhibits Neutrophil Adhesion during Experimental Extracorporeal Circulation. American Society of Anesthesiologists - Anesthesiology, Volume 89, p.443-448. 1998. Disponível em <<https://doi.org/10.1097/00000542-199808000-00021>>. Acesso em: 03/06/2025.

FEELISCH, M. et al. Systems redox biology in health and disease. EXCLI Journal, Volume 21, p. 623-646, 2022. doi: 10.17179/excli2022-4793. Acesso em: 28/05/2025.

FERNANDES, W. R. et al. Avaliação do estresse oxidativo em cavalos de trote através da mensuração de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) eritrocitária. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2012. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000700017>> Acesso em 15/05/2025.

FOSTER, M. W.; MCMAHON, T. J.; STAMLER, J. S. S-nitrosylation in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, Elsevier Ltd, Vol.9, No.4, p. 160-168. 2003. doi:10.1016/S1471-4914(03)00028-5. Acesso em: 02/06/2025.

GKALIAGKOUSI, E.; FERRO, A. Nitric oxide signalling in the regulation of cardiovascular and platelet function. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed)*, Volume 16, p. 1873-1897, 2011. Disponível em <<https://doi.org/10.2741/3828>>. Acesso em:02/06/2025.

HOTCHKISS, R. S. et al. Sepsis and septic shock. *Nature Reviews | Disease Primers*, Volume 2, Article number: 16045, 2016. doi:10.1038/nrdp.2016.45. Acesso em: 15/05/2025.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. Glutathiona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, Vol. 31, No. 5, p. 1170-1179. 2008. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500046>> . Acesso em: 28/05/2025.

KIM, B.S. et al. Inhibition of lipid infusion-induced skeletal muscle insulin resistance by cotreatment with tempol and glutathione in mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, volume 110, n. 3, p. 370–380, 2009. doi: 10.1254/jphs.09046FP. Acesso em: 01/06/2025.

KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J*, Volume 298, p. 249-258. 1994. doi: 10.1042/bj2980249. Acesso em: 28/05/2025.

KOSUGI, H.; KIKUGAWA, K. Thiobarbituric acid reaction of aldehydes and oxidized lipids in glacial acetic acid. *Lipids*, Volume 20, Issue 12, p. 915-921, 1985. Disponível em <<https://doi.org/10.1007/BF02534777>>. Acesso em: 02/06/2025.

LIAW, W. J. et al. Effects of a membrane-permeable radical scavenger, Tempol, on intraperitoneal sepsis-induced organ injury in rats. *Shock*, Volume 23, n. 1, p. 88–96, 2005. doi: 10.1097/01.shk.0000145937.70085.89. Acesso em: 02/06/2025.

MATEOS, R. et al. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress: Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *Journal of Chromatography B*, Volume 827, Issue 1, p. 76-82, 2005. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.06.035>>. Acesso em: 02/06/2025.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dia mundial da sepse: Brasil tem alta taxa de mortalidade por sepse entre os países em desenvolvimento, 2023. Disponível em <<https://www.gov.br/ebserh/pt-br/hospitais-universitarios/regiao-sudeste/hu-ufjf/comunicacao/noticias/2023/dia-mundial-da-sepse-brasil-tem-alta-taxa-de-mortalidade-por-sepse-dentre-os-paises-em-desenvolvimento>>. Acesso em 01/09/2025.

MOREIRA, D. H. Avaliação do efeito do tempol sobre a resposta pressórica da noradrenalina durante o choque séptico: participação na S-nitrosilação. Tese de Pós-Graduação em Farmacologia UFSC. Repositório Institucional UFSC. 2024. Disponível em <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/262990>>. Acesso em:22/06/2025.

NOZIK-GRAYCK, E. et al. S-nitrosoglutathione inhibits 1-adrenergic receptor-mediated vasoconstriction and ligand binding in pulmonary artery. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, Volume 290, p. 136–143, 2006. doi:10.1152/ajplung.00230.2005. Acesso em 28/05/2025.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev*, Volume 87, p. 315–424, 2007. doi: 10.1152/physrev.00029.2006. Acesso em: 28/04/2025.

REES, D. D. et al. Nitric oxide and the haemodynamic profile of endotoxin shock in the conscious mouse. *British Journal of Pharmacology*, Volume 124, Issue 3, p. 540-546, 2009. Disponível em <<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701815>>. Acesso em 11/05/2025.

ROSSELLI, M.; KELLER, P. J.; DUBEY, R. K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction Update*, Vol. 4, No. 1, p. 3–24, 1998. Disponível em <<https://doi.org/10.1093/humupd/4.1.3>>. Acesso em: 28/05/2025.

SELJESKOG, E.; HERVIG, T.; MANSOOR, M. A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. *Clinical Biochemistry*, Vol. 39, Issue 9, p. 947-954, 2006. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2006.03.012. Acesso em: 02/04/2025.

SIES, H. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants MDPI Journals* Volume 9, p. 852, 2020. doi:10.3390/antiox9090852. Acesso em: 05/06/2025.

SINGER, M. et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - Journal of the American Medical Association*, Volume 315, No. 8, p. 801-810, 2016. doi: 10.1001/jama.2016.0287. Acesso em: 12/05/2025.

STAERCK, C. et al. Microbial antioxidant defense enzymes. *Microbial Pathogenesis*, Volume 110, p. 56-65, 2017. doi: 10.1016/j.micpath.2017.06.015. Acesso em: 02/06/2025.

TOUSOULIS, D. et al. The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. *Current Vascular Pharmacology*, Volume. 10, No. 1, 2012. Disponível em <<https://doi.org/10.2174/157016112798829760>>. Acesso em: 28/05/2025.

TORRES-DUENAS, D. et al. Peroxynitrite mediates the failure of neutrophil migration in severe polymicrobial sepsis in mice. *British Journal of Pharmacology*, Volume 152, Issue 3 p. 341-352, 2009. Disponível em <<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707393>>. Acesso em: 12/05/2025.

TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry*, Volume. 524, p. 13–30, 2017. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.021>>. Acesso em: 11/06/2025.

VILLA, P. et al. Glutathione Protects Mice from Lethal Sepsis by Limiting Inflammation and Potentiating Host Defense. *The Journal of Infectious Diseases*,

Volume 185, Issue 8, p. 1115–1120, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1086/340042>>. Acesso em: 02/06/2025.

WEBBER, R. J.; SWEET, R. M.; WEBBER, D. S. Inducible Nitric Oxide Synthase in Circulating Microvesicles: Discovery, Evolution, and Evidence as a Novel Biomarker and the Probable Causative Agent for Sepsis. *Journal of Applied Laboratory Medicine*, Volume 3, n. 4, p. 698–711, 2019. Disponível em <<https://doi.org/10.1373/jalm.2018.026377>>. Acesso em: 28/05/2025.

WU, F.; Wilson, J. X; Tyml, K. Ascorbate inhibits iNOS expression and preserves vasoconstrictor responsiveness in skeletal muscle of septic mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, Volume 285:1, R50-R56 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00564.2002>>. Acesso em: 30/05/2025.

WICHTERMAN, K. A; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock—A review of laboratory models and a proposal. *Journal of Surgical Research*, Volume 29, Issue 2, p. 189-201, 1980. Disponível em <[https://doi.org/10.1016/0022-4804\(80\)90037-2](https://doi.org/10.1016/0022-4804(80)90037-2)>. Acesso em: 11/05/2025.

ZABET, M. H. et. al. Effect of high-dose Ascorbic acid on vasopressor's requirement in septic shock. *Journal of Research in Pharmacy Practice*, Volume. 5, n. 2, p. 94, 2016. doi: 10.4103/2279-042X.179569. Acesso em: 11/06/2025.