



**UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**WILLIAN MARGOTTI**

**ESTRESSE OXIDATIVO EM MÚLTIPLOS ÓRGÃOS EM RATOS VELHOS APÓS**  
**SEPSE: UM ESTUDO PRÉ-CLÍNICO**

Tubarão  
2021

**WILLIAN MARGOTTI**

**ESTRESSE OXIDATIVO EM MÚLTIPLOS ÓRGÃOS EM RATOS VELHOS APÓS  
SEPSE: UM ESTUDO PRÉ-CLÍNICO**

**LINHA DE PESQUISA:** Investigação de agravos à saúde de origem infecciosa

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Fabrícia Petronilho, Dra.

Tubarão  
2021

M28 Margotti, Willian, 1980 -  
Estresse oxidativo em múltiplos órgãos em ratos velhos após  
sepsis : um estudo pré-clínico / Willian Margotti. – 2021.  
64 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Sul de Santa Catarina,  
Pós-graduação em Ciências da Saúde.  
Orientação: Prof.ª Dr.ª Fabrícia Petronilho

1. Sepsis. 2. Envelhecimento. 3. Stress oxidativo. 4. Disfunção  
múltiplos órgãos. I. Petronilho, Fabrícia. II. Universidade do Sul de  
Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 617.22

Ficha catalográfica elaborada por Carolini da Rocha CRB 14/1215.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO**

Título da Dissertação

Estresse oxidativo em múltiplos órgãos em idosos após sepse: um estudo pré-clínico

**WILLIAN MARGOTTI**  
AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 28 de julho de 2021.

Doutora Fabricia Cardoso Petronilho (Orientador)



Doutora Naiana da Rosa (Avaliador externo – UNIBAVE) – *presente por videoconferência*

Doutor Rafael Mariano de Bitencourt (Avaliador interno) – *presente por videoconferência*



*Professor Doutor Jefferson Traebert*  
COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNISUL

- Unisul - Universidade do Sul de Santa Catarina, Sede, Reitoria - Av. José Acácio Moreira, 787, Bairro Dehon - 88704-900, Tubarão, SC - Fone 48 3621.3000
- Unisul Região Sul
  - Campus Tubarão - Avenida José Acácio Moreira, 787, Bairro Dehon, Caixa Postal 370 - 88704-900, Tubarão, SC - Fone 48 3621.3000
  - Campus Araranguá - Rodovia Governador Jorge Lacerda, 3201, Bairro Urussanguinha - 88905-355, Araranguá, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3521-3000
  - Campus Braço do Norte - Rodovia SC 370, 1023, Rio Bonito - 88750-000, Braço do Norte, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3621-3925
  - Campus Içara - Rua Linha Três Ribeirões, Loteamento Centenário, 250, Bairro Liri - 88820-000, Içara, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3621-3460
- Unisul Região Grande Florianópolis
  - Campus Pedra Branca - Avenida Pedra Branca, 25, Cidade Universitária Pedra Branca, 88137-270, Palhoça, SC - Fone 48 3279.1000
  - Campus Florianópolis - Rua DIB Mussi, 366, Centro - 88015-110, Florianópolis, SC - Fone 48 3279.1000
    - Rua Trajano, 219, Centro - 88010-010, Florianópolis, SC - Fone 48 3279.1000
- Campus Unisul Digital - Av. Pedra Branca, 25 - Cidade Universitária Pedra Branca - 88137-900, Palhoça, SC - Fone 48 3279.1200

*A todos que sofrem, lutam e estudam a  
sepsis.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e a minha amada família.

Aos professores, colaboradores e em especial a minha orientadora Fabrícia Cardoso Petronilho.

A UNISUL e ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Ao Laboratório e aos colegas do Neuroimet.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, PROSUC/ CAPES pelo apoio recebido em propiciar fomento para a realização desta pesquisa.

A todos, meu muito obrigado!

*“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.” (Isaac Newton)*

## RESUMO

A proporção da população com mais de 60 anos tem aumentado em todo mundo. O envelhecimento é um processo dinâmico, no qual ocorrem modificações morfológicas e fisiológicas em todos os níveis, tornando o organismo mais vulnerável a eventos agudos. Os idosos têm maior risco de desenvolver sepse do que os mais jovens. A sepse é um conjunto de manifestações graves em todo o corpo produzidas por uma infecção, levando a alterações que comprometem a homeostase celular e podem resultar em disfunção de múltiplos órgãos. Evidências sugerem que o estresse oxidativo está intrinsecamente relacionado ao envelhecimento e a sepse. O objetivo deste estudo foi avaliar o estresse oxidativo em múltiplos órgãos em ratos velhos em modelo animal de sepse polimicrobiana. Ratos Wistar machos adultos (60d) e velhos (210d) foram submetidos à sepse por ligação e perfuração cecal (CLP) e grupo controle (sham) somente a laparotomia. Os grupos experimentais foram divididos em sham 60d, sham 210d, CLP 60d e CLP 210d. Vinte e quatro horas após a indução da sepse, a atividade da mieloperoxidase (MPO), dano oxidativo a lipídios e proteínas, atividades da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) foram avaliadas no pulmão, rim, fígado, coração, baço, quadríceps e diafragma. O envelhecimento potencializou o aumento da atividade da MPO no grupo CLP comparados aos mais jovens submetidos a CLP no pulmão, fígado e baço. O dano aos lipídios ocorreu em todas estruturas analisadas nos grupos CLP, enquanto apenas no pulmão, fígado e diafragma a peroxidação lipídica foi maior do grupo CLP 210d em comparação com 60d. O dano em proteína nessa potencialização aconteceu apenas no pulmão. A atividade da SOD nas estruturas analisadas foi diminuída em ambos os grupos CLP, sendo que no pulmão, rim, baço e diafragma houve uma diminuição significativa da SOD no grupo CLP 210d comparado ao sham 60d enquanto que na CAT somente no pulmão e rim. Os achados neste estudo apontam que o aumento da idade potencializou o dano oxidativo em diferentes órgãos alvo na sepse ao intensificar a presença de neutrófilos, o que fez possivelmente com que aumentasse o dano em lipídios e proteínas com redução da atividade da SOD e CAT.

**Descritores:** sepse, envelhecimento, estresse oxidativo, disfunção múltiplos órgãos.

## ABSTRACT

The proportion of the population over 60 years of age has increased worldwide. Aging is a dynamic process, in which morphological and physiological changes occur at all levels, making the body more vulnerable to acute events. Elderly people are at greater risk of developing sepsis than younger people. Sepsis is a set of serious manifestations throughout the body produced by an infection, leading to changes that compromise cell homeostasis and can result in dysfunction of multiple organs. Evidence suggests that oxidative stress is intrinsically related to aging and sepsis. The aim of this study was to evaluate multi-organ oxidative stress in old rats in an animal model of polymicrobial sepsis. Adult male Wistar rats (60d) and old (210d) were submitted to sepsis by cecal ligation and perforation (CLP) and control group (sham) only by laparotomy. The experimental groups were divided into sham 60d, sham 210d, CLP 60d and CLP 210d. Twenty-four hours after sepsis induction, myeloperoxidase (MPO) activity, oxidative damage to lipids and proteins, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities were evaluated in lung, kidney, liver, heart, spleen, quadriceps and diaphragm. Aging potentiated the increase in MPO activity in the CLP group compared to younger patients undergoing CLP in the lung, liver and spleen. Lipid damage occurred in all structures analyzed in the CLP groups, while only in the lung, liver and diaphragm the lipid peroxidation was higher in the CLP 210d group compared to 60d. The protein damage in this potentiation happened only in the lung. The SOD activity in the analyzed structures was decreased in both CLP groups, and in the lung, kidney, spleen and diaphragm there was a significant decrease in SOD in the CLP 210d group compared to the sham 60d group while in the CAT only in the lung and kidney. The findings in this study indicate that increasing age potentiated oxidative damage in different target organs in sepsis by intensifying the presence of neutrophils, which possibly increased the damage to lipids and proteins with reduced activity of SOD and CAT.

**Keywords:** sepsis, aging, oxidative stress, multiple organ dysfunction.

## LISTAS

### Lista de abreviaturas

ANOVA – Análise de Variância

ATP – Adenosina Trifosfato

CAT – Catalase

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CKm – Creatina quinase muscular

CLP – Ligação e perfuração cecal (do inglês, *cecal ligation and puncture*)

DAMPs - Padrões Moleculares Associados ao Dano (do inglês, *Damage-Associated Molecular Pattern*)

DCNT - Doenças Crônicas Não Transmissíveis

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *desoxyribonucleic acid*)

ERN's - Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO's - Espécies Reativas de Oxigênio

FADH<sub>2</sub> - Flavina Adenina Dinucleotídeo Reduzido

FiO<sub>2</sub> - Fração Inspirada de Oxigênio

GPx - Glutathione peroxidase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de Hidrogênio

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

iNOS – óxido nítrico sintase induzível (do inglês, *inducible nitric oxide synthase*)

LPA – Lesão Pulmonar Aguda

LPS – Lipopolissacarídeo

MODS – Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (do inglês, *multiple organ dysfunction syndrome*)

MPO – Mieloperoxidase

mtDNA – DNA mitocondrial (do inglês, *mitochondrial DNA*)

NADPH - Nicotina Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NF-κB - Fator Nuclear Kappa B (do inglês, *Nuclear Factor Kappa B*)

NO - Óxido Nítrico (do inglês, *nitric oxide*)

O<sub>2</sub> – Oxigênio molecular

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Ânion Superóxido

OH<sup>-</sup> – Hidroxila

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONOO<sup>-</sup> - peroxinitrito

PAMPs - Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Pattern*)

PaO<sub>2</sub> - Pressão Parcial de Oxigênio

PRR - Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissona (do inglês, *Pattern Recognition Receptor*)

SC – Subcutâneo

SOD - Superóxido Dismutase

TBARS – Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico

TLRs - Receptores *Toll-like* (do inglês, *Toll-like Receptors*)

TLR-4 - Receptores *Toll-like- 4*

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa, do inglês “*tumor necrosis factor alpha*”

UCP-2 - Proteína Mitocondrial de Desacoplamento (do inglês, *Mitochondrial Decoupling Proteins*)

#### Lista de figuras

Figura 1 – Mecanismo geral de dano oxidativo às biomoléculas.....	20
Figura 2 – Fluxograma do desenho experimental.....	45

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO .....	13
<b>1.1.1 Dados epidemiológicos de envelhecimento no Brasil</b> .....	13
<b>1.1.2 Envelhecimento</b> .....	15
1.1.2.1 Estresse oxidativo e envelhecimento dos múltiplos órgãos .....	18
1.1.2.1.1 <i>Estresse oxidativo</i> .....	18
1.1.2.1.2 <i>Envelhecimento do pulmão</i> .....	20
1.1.2.1.3 <i>Envelhecimento do rim</i> .....	22
1.1.2.1.4 <i>Envelhecimento do fígado</i> .....	23
1.1.2.1.5 <i>Envelhecimento do baço</i> .....	25
1.1.2.1.6 <i>Envelhecimento do coração</i> .....	26
1.1.2.1.7 <i>Envelhecimento do músculo esquelético</i> .....	28
<b>1.1.3 Definição de Seps e aspectos epidemiológicos</b> .....	30
<b>1.1.4 Fisiopatologia da seps e</b> .....	33
<b>1.1.5 Disfunção de órgãos na seps e</b> .....	35
<b>1.1.6 Modelo animal de seps e</b> .....	41
1.1.6.1 Ligação e perfuração cecal (CLP) .....	41
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	43
2.1 OBJETIVO GERAL .....	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
<b>3. MÉTODOS</b> .....	44
3.1 TIPO DE ESTUDO .....	44
3.2 ANIMAIS .....	44
3.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	44
<b>3.3.1 Indução da seps e por ligação e perfuração cecal</b> .....	44
<b>3.3.2 Coleta das amostras biológicas</b> .....	45
3.4 ENSAIOS/ TESTES/ TÉCNICAS .....	46
<b>3.4.1 Avaliação da atividade da mieloperoxidases</b> .....	46
<b>3.4.2 Avaliação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</b> .....	46
<b>3.4.3 Avaliação da carbonilação proteica</b> .....	46
<b>3.4.4 Determinação da atividade da superóxido dismutase</b> .....	47
<b>3.4.5 Determinação da atividade da catalase</b> .....	47
<b>3.4.6 Determinação da proteína total</b> .....	48
3.5 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS .....	48
3.6 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA .....	48
<b>4. ARTIGO</b> .....	49
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	51
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52
<b>ANEXO A- Parecer Aprovação do Comitê de Ética</b> .....	63

## 1. INTRODUÇÃO

A proporção da população mundial com mais de 60 anos tem aumentado e espera-se que o número de pessoas com mais de 60 anos aumente de 970 milhões para 2,1 bilhões em 2050 e 3,1 bilhões em 2100<sup>1</sup>. No Brasil, a tendência do envelhecimento da população brasileira nos últimos anos manteve-se e ganhou 4,8 milhões de idosos desde 2012, superando a marca dos 30,2 milhões em 2017. Em 2012, a população com 60 anos ou mais era de 25,4 milhões. Os 4,8 milhões de novos idosos em cinco anos correspondem a um crescimento de 18% desse grupo etário, que tem se tornado cada vez mais representativo no Brasil<sup>2</sup>.

O envelhecimento é um processo dinâmico, no qual ocorrem modificações morfológicas e fisiológicas em todos os níveis do organismo<sup>3</sup>. A morfologia e as funções do fígado, bem como de outros órgãos como coração, pulmão, rins, sistema imunológico, mudam com o envelhecimento<sup>4</sup>.

O processo de envelhecimento está frequentemente associado a organelas disfuncionais, que desencadeiam estresse oxidativo, dobramento incorreto de proteínas e morte celular, e induzem declínios na manutenção dos mecanismos de controle de qualidade celular. Em particular, uma característica patológica importante do envelhecimento, é o desenvolvimento de anormalidades mitocondriais, onde as espécies reativas de oxigênio (ERO's) se formam progressivamente como causa e efeito de danos às proteínas mitocondriais. O acúmulo de ERO's induz mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) e impede o ciclo do ácido tricarboxílico e o funcionamento dos complexos da cadeia de transporte de elétrons, comprometendo assim a função bioenergética da mitocôndria. Isso causa um ciclo vicioso que agrava progressivamente o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial<sup>5</sup>.

Como resultado da imunosenescência (a deterioração gradual do sistema imunológico), comorbidade e fragilidade geral, esta população é mais suscetível do que pessoas mais jovens a doenças infecciosas, resultando em taxas de mortalidade e morbidade mais altas do que em jovens adultos. As infecções podem levar à fragilidade irreversível e, portanto, a mais dependência de cuidados de saúde de longo prazo<sup>6</sup>.

Nesse contexto, a sepse afeta desproporcionalmente adultos mais velhos, com mais de 60% dos diagnósticos de sepse atribuídos a adultos com 65 anos ou mais<sup>7</sup>. A sepse é definida como uma disfunção orgânica com risco de vida, causada por uma

resposta desregulada do hospedeiro à infecção<sup>8</sup>. É uma causa comum de admissão em unidade de terapia intensiva (UTI) e pode levar à síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e morte<sup>9</sup>.

Tendo em vista que à medida que a população adulta continua a envelhecer e se transformar na população idosa, os problemas relacionados com a idade avançada continuarão a crescer em proporções iguais, assim como o risco de infecção. Por isso são necessários estudos adicionais para avaliar a fisiopatologia da sepse nesta população especial que é comumente afetada por infecções, e assim melhor conhecer esse grupo etário, já que se trata de uma população com identificação própria, com modificações corporais desde o nível sistêmico a níveis moleculares, inevitáveis e que precisa de cuidados e atenção especial.

Dessa forma, motivado pela falta de pesquisa relacionando o estresse oxidativo ocasionado na sepse em organismo cronologicamente velho, a seguinte pesquisa busca avaliar o estresse oxidativo em múltiplos órgãos em ratos velhos em modelo animal de sepse polimicrobiana por ligação e perfuração cecal (CLP).

Como hipótese acredita-se que o estresse oxidativo ocorra em ambos os grupos de modelo animal de sepse polimicrobiana por CLP quando comparados aos grupos controles, e dentre estes a injúria é maior nos grupos de ratos velhos.

## 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1.1 Dados epidemiológicos de envelhecimento no Brasil

O mundo está testemunhando uma rápida mudança demográfica em direção a uma população mais velha, uma tendência com importantes implicações médicas, sociais, econômicas e políticas<sup>10</sup>. Uma das causas desta mudança demográfica é o aumento da expectativa de vida ao nascer, que no Brasil, de 2015 para 2016 passou de 75,5 para 75,8 anos, o que representa um acréscimo de três meses e onze dias. Esse indicador mostra o tempo médio de vida das pessoas que nasceram em um determinado ano. Esses dados são da Tábua completa de mortalidade para o Brasil – 2016, divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e mostra que de 1940 a 2016, expectativa de vida do brasileiro subiu mais de 30 anos<sup>2</sup>.

Segundo a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua – Características dos Moradores e Domicílios, em 2012, a população com 60 anos ou

mais era de 25,4 milhões. Os 4,8 milhões de novos idosos em cinco anos correspondem a um crescimento de 18% desse grupo etário, que tem se tornado cada vez mais representativo no Brasil. As mulheres são maioria expressiva nesse grupo, com 16,9 milhões (56% dos idosos), enquanto os homens idosos são 13,3 milhões (44% do grupo)<sup>2</sup>.

Estudos epidemiológicos mostram que 11% da população mundial tem mais de 60 anos e projeta-se que isso aumente, até 2050, para 22% da população<sup>11</sup>. No Brasil, os dados de projeções do IBGE apontam que a população idosa acima de 60 anos deve dobrar até o ano de 2042, na comparação com os números de 2017. De acordo com o levantamento, o país tinha 28 milhões de idosos no ano de 2017, ou 13,5% do total da população. Em dez anos, chegará a 38,5 milhões (17,4% do total de habitantes). Em 2042, a projeção do IBGE é de que a população brasileira atinja 232,5 milhões de habitantes, sendo 57 milhões de idosos (24,5%), ultrapassando o projetado para a população mundial até 2050. Em 2031, o número de idosos (43,2 milhões) vai superar pela primeira vez o número de crianças e adolescentes, de 0 a 14 anos (42,3 milhões). Antes de 2050, os idosos já serão um grupo maior do que a parcela da população com idade entre 40 e 59 anos<sup>12</sup>.

Com o processo de envelhecimento populacional, é crescente o número de óbitos entre as pessoas acima de 60 anos. A crescente proporção de idosos na população e a considerável redução da mortalidade infanto-juvenil, observada nas últimas décadas, contribuíram para elevar a concentração das mortes em idades mais avançadas no Brasil. Atualmente, de cada 100 óbitos ocorridos no Brasil, 63 correspondem a pessoas de 60 anos ou mais de idade, o que em 1980, essa participação era de 38%<sup>13</sup>.

Doenças do aparelho circulatório, neoplasias e doenças do aparelho, respiratório aparecem como as principais causas atuais de mortalidade desse grupo populacional, seguidas pelas doenças do aparelho digestivo e das glândulas endócrinas<sup>14</sup>.

À medida que a sociedade envelhece, a incidência de limitações físicas aumenta drasticamente, o que reduz a qualidade de vida e aumenta os gastos com saúde. Na sociedade ocidental, cerca de 30% da população com mais de 55 anos enfrenta limitações físicas moderadas ou severas. Essas limitações físicas aumentam o risco de quedas, institucionalização, comorbidade e morte prematura<sup>15</sup>.

A preocupação com a incapacidade e com o seu impacto na qualidade de vida como assunto de saúde pública justifica-se pelo envelhecimento populacional rápido e intenso, e pela alta prevalência de doenças crônicas causadoras de limitações funcionais e de incapacidades entre os idosos. A avaliação das intervenções em saúde na população idosa frágil sempre constituiu um desafio devido ao caráter múltiplo e complexo dos seus problemas<sup>13</sup>.

### **1.1.2 Envelhecimento**

O envelhecimento pode ser entendido como um processo dinâmico e progressivo, caracterizado tanto por alterações morfológicas, funcionais e bioquímicas, quanto por modificações psicológicas<sup>16</sup>. É um declínio gradual da função fisiológica com a idade, acompanhado de um processo intrínseco, inevitável e irreversível relacionado à idade. Envelhecer é um fenômeno complexo onipresente como consequência da interação de fatores genéticos, epigenéticos, ambientais e estocásticos ao longo da vida. Durante esse processo multifatorial, os danos que ocorrem nas moléculas, células e tecidos se acumulam gradualmente em tempo hábil<sup>17</sup>. Tal processo leva a um progressivo decréscimo na capacidade fisiológica e redução da capacidade de respostas ao estresse ambiental, levando a um aumento da suscetibilidade e vulnerabilidade a doenças e consequentemente à morte<sup>18</sup>.

Muitas teorias sobre o envelhecimento já foram propostas, incluindo a reticulação molecular, alterações nas funções imunológicas, encurtamento do telômero, presença de genes de senescência no DNA e danos induzidos por radicais livres<sup>19</sup>. O aumento da produção de radicais livres foi reconhecido como um contribuidor crítico para o envelhecimento desde meados dos anos 50, quando D. Harman propôs “The free Radical Theory of Aging” (A teoria do envelhecimento dos radicais livres). Esta teoria propôs que moléculas altamente instáveis e reativas geradas pelo metabolismo celular ou fatores ambientais não podem ser removidas ou neutralizadas, e que o acúmulo destes produz danos aos lipídios, proteínas e DNA, levando a uma função defeituosa das organelas em indivíduos idosos. Atualmente, sabe-se que durante o terço final da vida, animais e humanos idosos têm capacidades homeostáticas adaptativas mais baixas, principalmente causada por um sistema de defesa antioxidante prejudicado, que por sua vez promove o acúmulo de danos moleculares induzidos pelo estresse oxidativo e desencadeia a senescência celular<sup>17</sup>.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), idoso é todo indivíduo com 60 anos ou mais. Todavia, para efeito de formulação de políticas públicas, esse limite mínimo pode variar segundo as condições de cada país. A própria OMS reconhece que, qualquer que seja o limite mínimo adotado, é importante considerar que a idade cronológica não é um marcador preciso para as alterações que acompanham o envelhecimento, podendo haver grandes variações quanto a condições de saúde, nível de participação na sociedade e nível de independência entre as pessoas idosas, em diferentes contextos<sup>20</sup>.

Estima-se que o ser humano esteja programado para viver entre 110 e 120 anos. Seu ciclo vital atinge maturidade biológica, o ápice da vitalidade, por volta dos 25, 30 anos. Dos 25 até os 40 o indivíduo pode ser considerado um adulto inicial; até 65 anos, adulto médio ou de meia idade, dos 65 até 75 anos, adulto tardio na velhice precoce, e desta idade em diante, vem a chamada velhice tardia<sup>21</sup>.

Os indivíduos com idade igual ou superior a 60 anos diferem muito entre si no que diz respeito às condições de saúde. Não obstante a alta prevalência de incapacidade entre idosos, o declínio funcional não é intrínseco ao envelhecimento<sup>22</sup>. Estatísticas gerais têm mostrado que, à medida que cada indivíduo atinge a meia-idade de sua vida biológica, numerosas consequências malignas, patológicas e deteriorativas subsequentes começam a interferir no sistema cardiovascular, processos metabólicos, distúrbios neurodegenerativos, funções musculares e visuais, entre outros<sup>17</sup>.

O envelhecimento pode ser entendido como sinônimo de senescência (processo natural de envelhecimento) quando a diminuição progressiva da reserva funcional do indivíduo em questão não acarreta maiores problemas, mas também pode cursar com doenças, estresse emocional ou acidentes, levando à necessidade de atenção diferenciada, sendo conhecido então como senilidade e se caracterizando pela fragilidade do envelhecimento<sup>23</sup>. A definição de fragilidade do envelhecimento mais amplamente aceita é a de estado de vulnerabilidade, resultado da diminuição da reserva homeostática, que confere menor capacidade de superar fatores de estresse e menor poder de adaptação<sup>24</sup>. Mesmo não havendo consenso em torno da definição, tampouco quadro clínico bem definido, a prática clínica mostra a grande prevalência em idosos frágeis de algumas síndromes geriátricas geradoras de dependência: déficit cognitivo, imobilidade, instabilidade postural e incontinência urinária<sup>25</sup>.

A ineficiência metabólica, que contribui substancialmente para a quebra da homeostasia corporal, lentamente, torna o indivíduo mais suscetível a lesões orgânicas, culminando no desencadeamento das chamadas doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), decorrentes do processo de envelhecimento. Essas doenças são e podem desencadear processos incapacitantes, afetando a funcionalidade dos indivíduos idosos, dificultando ou impedindo o desempenho de suas atividades cotidianas de forma independente, o que pode comprometer de maneira significativa a qualidade de vida dos idosos<sup>26</sup>.

Os idosos com idade mais avançada e os idosos mais jovens portadores de múltiplas DCNT, quando sobrevivem evento agudo (infecções, quedas e distúrbios metabólicos), suas deficiências imunológicas e nutricionais e o declínio acentuado de suas funções vitais determinam a hospitalização e o mau prognóstico<sup>27</sup>.

De modo geral, o processo de envelhecimento, é um fenômeno natural e multifatorial caracterizado pelo acúmulo de processos degenerativos que, por sua vez, são sustentados por múltiplas alterações e danos nas vias moleculares com envolvimento de complexas mudanças celulares que afetam a integridade e comprometem as funções das diversas células, tecidos e sistemas, de maneira qualitativa e quantitativa<sup>28</sup>.

Dessa forma, diversos são os mecanismos que contribuem para o declínio multifuncional de órgãos e tecidos durante o processo de envelhecimento. O acúmulo de proteínas e mitocôndrias danificadas é comumente observado em células envelhecidas. Além disso, a produção de ERO's em vários órgãos é aumentada progressivamente ao longo dos anos, devido ao vazamento de elétrons das mitocôndrias resultante da fosforilação oxidativa mitocondrial prejudicada e um desequilíbrio entre a produção de ERO's e a síntese de enzimas antioxidantes<sup>5</sup>. As ERO's - intermediários parcialmente reduzidos de oxigênio que podem ser moléculas radicais ou não radicais - são geradas durante o metabolismo por meio de uma série de reações inter-relacionadas e são considerados como causadores dos danos cumulativo de DNA, proteína e lipídios observados ao longo da vida. O acúmulo de ERO's, o estresse oxidativo e o desequilíbrio do estado redox normal aumentam exponencialmente com a idade, acompanhados por um declínio acentuado da maquinaria de reparo celular<sup>19</sup>.

Por fim, o estresse oxidativo está associado à abertura dos poros da permeabilidade mitocondrial, que promove necrose e morte celular em diversos órgãos<sup>5</sup>.

#### 1.1.2.1 Estresse oxidativo e envelhecimento dos múltiplos órgãos

##### 1.1.2.1.1 *Estresse oxidativo*

O “estresse oxidativo” como um conceito em biologia e medicina redox foi formulado em 1985<sup>29</sup>. O oxigênio molecular tem pouca capacidade de oxidar outros compostos químicos e, para isso, deve primeiramente ser convertido em forma “ativa” de oxigênio, as então chamadas ERO's<sup>30</sup>.

As ERO's são radicais livres com oxigênio em sua estrutura molecular ou não radicais mas com potencialidade de formarem radicais livres de oxigênio. São normalmente produzidas nas células durante a respiração e geração de energia mitocondrial, ou na resposta inflamatória, mas são degradadas e removidas pelos sistemas celulares de defesa antioxidante. Portanto, as células são capazes de manter um estado constante no qual as ERO's podem estar presentes transitoriamente, em baixas concentrações, sem causar danos<sup>31</sup>.

Quando a produção de ERO's aumenta ou quando os sistemas de remoção são ineficientes, o resultado é um excesso destas espécies que levam a uma condição chamada estresse oxidativo. O estresse oxidativo tem sido implicado em uma grande variedade de processos patológicos, incluindo lesão celular, câncer, envelhecimento e algumas doenças degenerativas, como a doença de Alzheimer<sup>32</sup>. As ERO's são produzidas também em grandes quantidades pelos leucócitos, particularmente neutrófilos e macrófagos, como mediadores para a destruição de microorganismos, tecido morto e outras substâncias não desejadas. Portanto, a lesão causada por esses compostos reativos sempre acompanha reações inflamatórias, durante as quais os leucócitos são recrutados e ativados<sup>31</sup>.

Além do processo inflamatório, as ERO's podem ser geradas nas reações de oxirredução que ocorrem durante processos metabólicos normais. Durante a respiração normal, o oxigênio molecular é reduzido nas mitocôndrias através da transferência de quatro elétrons para o H<sup>2</sup> para gerar duas moléculas de água. Essa conversão é catalisada por enzimas oxidativas no retículo endoplasmático, citosol,

mitocôndrias, peroxissomos e lisossomos. Durante esse processo, são geradas pequenas quantidades de espécies intermediárias parcialmente reduzidas nas quais diferentes números de elétrons foram transferidos do oxigênio molecular ( $O_2$ ), que incluem os radicais ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e íons hidroxila ( $OH^-$ )<sup>31</sup>.

Outro mediador químico importante gerado por células endoteliais, macrófagos, e outros tipos celulares, o NO, pode atuar como radical livre e também ser convertido no ânion peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) altamente reativo, bem como em dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ) e nitrato ( $NO_3^-$ )<sup>31</sup>.

Em contrapartida, os tecidos contêm enzimas que removem rapidamente essas espécies<sup>33</sup>. Essas enzimas localizam-se próximas ao local de geração dos oxidantes e incluem as enzimas: (1) Superóxido dismutases (SODs) que são encontradas em muitos tipos celulares e convertem o  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  ( $2O_2^- + 2H \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ). Esse grupo inclui a manganês-superóxido dismutase, que se localiza nas mitocôndrias e a cobre-zinco-superóxido dismutase, que é encontrada no citosol. (2) Catalase (CAT), presente nos peroxissomos, que decompõe o  $H_2O_2$  ( $2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$ ). (3) A glutathiona peroxidase também protege contra lesão catalisando a degradação de radicais livres ( $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG$  [homodímero de glutathiona] +  $2 H_2O$  ou  $2OH^- + 2GSH \rightarrow GSSG + 2 H_2O$ ). A proporção intracelular de glutathiona oxidada (GSSG) para glutathiona reduzida (GSH) reflete o estado oxidativo da célula e é um indicador importante da habilidade das células de desintoxicar ERO's<sup>31</sup>.

Quando as enzimas antioxidantes não são suficientes para neutralizar as ERO's, ocorre o dano a biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA (ácido desoxirribonucleico) evento conhecido como estresse oxidativo. Um dos principais efeitos é oxidar os ácidos graxos poli-insaturados que são componentes essenciais de muitas das membranas celulares. Outro efeito é oxidar algumas das enzimas celulares, danificando gravemente os sistemas metabólicos celulares<sup>23</sup>. O dano oxidativo aos lipídios produz produtos de peroxidação lipídica, principalmente localizados na membrana celular, o que resulta em uma perda das propriedades / funções da membrana. Seus produtos finais reativos podem induzir danos a outras moléculas, como proteínas e DNA. No DNA nuclear e mitocondrial, a 8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) é uma das formas predominantes de lesões oxidativas induzidas por radicais livres. Os resultados potenciais incluem disfunção das biomoléculas afetadas e interferência nas vias de sinalização (Figura 02)<sup>19</sup>.

Tem-se visto que a superexpressão da CAT estende a vida útil e retarda o processo de envelhecimento em camundongos<sup>34</sup>. Essas observações sugerem que o acúmulo de ERO's contribui para o processo de envelhecimento e sobre a importância das enzimas antioxidantes.

Figura 01 – Mecanismo geral de dano oxidativo às biomoléculas

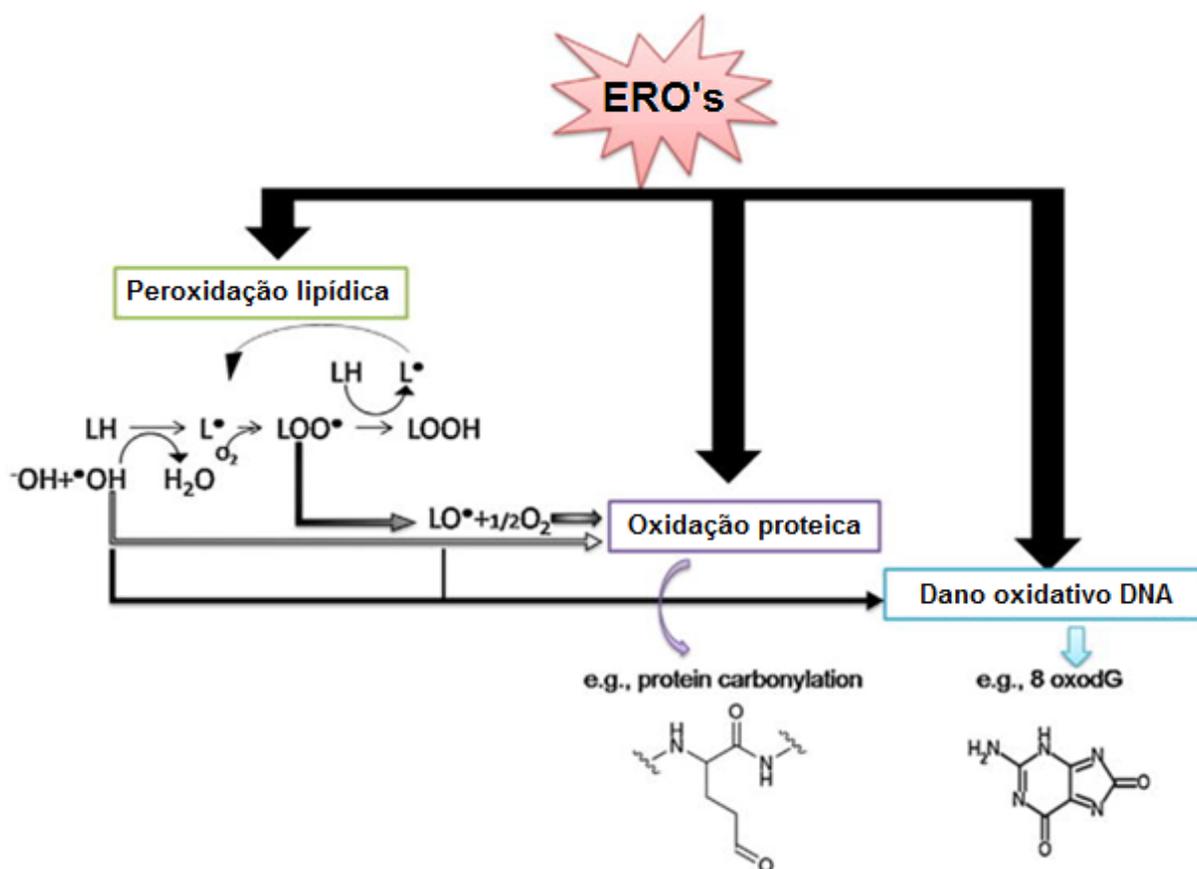


Fig 01 – Adaptado de: da Costa JP., et al, 2016<sup>19</sup>

### 1.1.2.1.2 Envelhecimento do pulmão

Pensa-se que o sistema respiratório seja o sistema do organismo que envelhece mais rapidamente devido à maior exposição a poluentes ambientais ao longo dos anos. As mudanças que ocorrem a este nível são clinicamente relevantes porque a deterioração da função pulmonar está associada ao aumento da taxa de mortalidade e, além disso, o conhecimento das mesmas contribui para a detecção e prevenção de disfunções respiratórias em idosos<sup>35</sup>.

No plano anatômico e funcional do trato respiratório, destacam-se as reduções da mobilidade da caixa torácica e da elasticidade pulmonar, a diminuição

dos valores de pressão inspiratória e expiratória máxima com consequente redução da eficiência da tosse, e ainda a diminuição do número e motilidade dos cílios na árvore respiratória. O processo da imunossenescência, por sua vez, ocasiona diminuição da imunidade celular, não tão intensa a ponto de provocar o aparecimento de infecções oportunistas, porém predispondo a processos infecciosos em geral, além de dificultar sua resolução<sup>36</sup>.

Nesse sentido, o processo de envelhecimento e a exposição constante ao ambiente externo torna o pulmão especialmente vulnerável à infecção<sup>37</sup>. Seja bacteriana, fúngica ou viral, a infecção gera uma resposta inflamatória e o subsequente acúmulo de células inflamatórias, como macrófagos (alveolares residentes e recrutados), eosinófilos e neutrófilos. Como um mecanismo de defesa imunológico, as células imunes respondem produzindo mieloperoxidases (MPO), peroxidases de eosinófilos, nicotina adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases ligadas à membrana e de fonte mitocondrial, e os produtos incluem ERO's como  $O_2^-$ , NO,  $H_2O_2$  e ácido hipocloroso. Idealmente, esses produtos reativos são capazes de destruir organismos invasores e supra regular vias de sinalização apropriadas para restaurar a homeostase celular, mas o dano residual nos tecidos geralmente ocorre. Além disso, vários organismos infecciosos comuns produzem suas próprias ERO's como parte de seus mecanismos de defesa<sup>33</sup>.

Embora apresentem um papel de extrema importância nos processos biológicos normais, as ERO's estão associadas à origem de diversas patologias e ao envelhecimento<sup>38</sup>. Muitas células do parênquima pulmonar são fontes de radicais livres no pulmão, capazes de gerar ERO's, como as células endoteliais, células alveolares tipo II, células claras, células ciliadas da via aérea, e os macrófagos alveolares<sup>39</sup>.

Com relação ao trato respiratório, as mudanças provocadas pelas ERO's podem resultar em destruição direta de células, particularmente pneumócitos tipo I e células endoteliais. A destruição do tecido elástico pulmonar pelas ERO's atenua a complacência pulmonar e, conseqüentemente, diminui sua capacidade de expansão durante a respiração. As EROs são capazes de alterar o tônus da musculatura lisa das vias aéreas, pela criação de um desbalanço entre receptores muscarínicos (contração) e  $\beta$ -adrenérgicos (relaxamento). Um aumento na formação das EROs pode levar até mesmo a danos na microcirculação regional e, conseqüentemente, derrame de fluido rico em proteínas no interior dos alvéolos. Esse derrame e a

atividade EROs degradam o surfactante, levando a um colapso dos alvéolos e, conseqüentemente, a aumento da resistência pulmonar. O estresse oxidativo aumenta ainda a secreção de mucina pelo epitélio respiratório, o que diminui a eficiência do batimento ciliar, deixando as vias aéreas susceptíveis a infecções<sup>40</sup>.

#### *1.1.2.1.3 Envelhecimento do rim*

Como em todos os sistemas orgânicos, o processo de envelhecimento leva a alterações significativas, sendo o rim particularmente suscetível a alterações relacionadas à idade<sup>41</sup>. O envelhecimento é um dos principais contribuintes para o aumento da incidência de lesão renal aguda e doença renal crônica, sendo que o principal achado clínico do envelhecimento renal é a diminuição da taxa de filtração glomerular e seu correlato estrutural é a perda de néfrons funcionais<sup>42</sup>. A função renal diminui com a idade na população em geral e a perda média da taxa de filtração glomerular (TFG) é de cerca de 1ml por ano na maioria dos estudos longitudinais<sup>43</sup>.

A recuperação funcional renal após um episódio de lesão renal aguda é significativamente pior em pacientes idosos. Esse potencial regenerativo diminuído, que é uma marca registrada do processo de envelhecimento, pode ser causado pela senescência celular. O acúmulo de células senescentes pode explicar o reparo insuficiente e a perda funcional, visão reforçada por estudos recentes que mostram que a remoção das células senescentes resulta na atenuação do envelhecimento renal<sup>42</sup>.

As mudanças estruturais macroanatômicas do rim com a idade avançada incluem um menor volume cortical, maior volume medular até a meia-idade e cistos renais maiores e mais numerosos. Os idosos têm menos reserva funcional renal quando na verdade desenvolvem doença renal crônica e apresentam maior risco de lesão renal aguda<sup>44</sup>.

O rim passa por mudanças relacionadas à idade, atingindo a funcionalidade total após os 5 anos de idade e sofrendo um declínio lento, mas progressivo em sua faixa regulatória de função (por exemplo, combinando a excreção de sódio e potássio com a ingestão alimentar), a partir de aproximadamente 20 anos, bem como na função (por exemplo, filtração glomerular) começando em uma idade mais avançada. O declínio da função renal relacionado à idade também é uma questão de gênero, raça e origem genética<sup>45</sup>.

Nos processos fisiopatológicos das doenças renais a inflamação desempenha um papel fundamental. A inflamação sistêmica também afeta o rim por meio de citocinas pró-inflamatórias e infiltração de células inflamatórias<sup>46</sup>. Patogeneticamente, além dos mediadores da inflamação crônica, mediadores do sistema renina-angiotensina-aldosterona e do estresse oxidativo são fatores relevantes na determinação do envelhecimento renal, devido ao aumento da incidência de dano celular combinado com redução da capacidade de reparo<sup>45</sup>.

O processo de envelhecimento do rim é sempre acompanhado de mudanças estruturais e funcionais<sup>47</sup>. Fatores, como a existência de declínio leve a moderado da função renal, anormalidades no turnover de droga e desregulação da vasculatura, foram implicados na patogênese da susceptibilidade relacionada ao envelhecimento. Uma vez que o rim naturalmente também enfrenta um aumento da carga oxidante com o declínio da atividade antioxidante ao longo do envelhecimento<sup>48</sup>. Os fatores acima combinados com várias patologias, incluindo doenças infecciosas podem causar a lesão renal aguda e induzem diminuições gerais ou regionais no fluxo sanguíneo renal. A hipóxia renal e a isquemia subsequentes promovem a formação de EROs adicionais, que podem induzir lesão celular do túbulo renal, inflamação e causar disfunção vascular<sup>49</sup>.

#### *1.1.2.1.3 Envelhecimento do fígado*

Geralmente, o envelhecimento do fígado apresenta um declínio no volume e no fluxo sanguíneo hepático. Mesmo com uma capacidade regenerativa proeminente de restaurar suas funções após a perda de células hepáticas, sua biossíntese e habilidades de metabolismo diminuem, e são difíceis de restaurar aos padrões anteriores<sup>50</sup>.

Indivíduos idosos estão particularmente sob risco de desenvolver doenças crônicas, embora sejam menos capazes de regenerar tecidos saudáveis e tolerar procedimentos de transplante de órgãos inteiros. No fígado, essas doenças relacionadas à idade incluem doença hepática gordurosa não alcoólica, doença hepática alcoólica, hepatite, fibrose e cirrose<sup>51</sup>.

Embora o fígado demonstre notável resiliência durante o envelhecimento, há evidências crescentes de que ele sofre todas as características celulares do envelhecimento, o que aumenta o risco de doenças hepáticas e sistêmicas. O

processo de envelhecimento no fígado é impulsionado por alterações do genoma e do epigenoma que contribuem para a desregulação da função mitocondrial e das vias de detecção de nutrientes, levando à senescência celular e inflamação de baixo grau. Essas alterações promovem várias alterações fenotípicas em todas as células hepáticas (hepatócitos, células endoteliais sinusoidais do fígado, células estreladas hepáticas e células de Küpffer) e comprometimento da função hepática<sup>52</sup>.

Muitos estudos relataram que o fígado senescente exibe uma série de características consistentes com lesão oxidativa e os níveis de EROs nos tecidos afetam as funções hepáticas e estão intimamente ligados à maioria das doenças. Durante o processo de envelhecimento a superprodução de EROs leva a um estado de dano oxidativo tanto no fígado quanto no nível sistêmico que ocorre já na meia-idade<sup>53</sup>.

Uma produção desequilibrada de EROs ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e as moléculas antioxidantes do organismo produz estresse oxidativo, que pode induzir lesão hepatocelular pela inibição das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e pela inativação de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e dos canais de sódio de membrana. Além disso, as EROs causam peroxidação lipídica e produção de citocinas, contribuindo para lesão hepatocelular e fibrose, e promovem a progressão de esteatose simples para esteatose hepática não alcoólica. Adicionalmente, as EROs induzem a migração direcional de células pró-fibrogênicas hepáticas residentes, resultando em fibrose hepática<sup>17</sup>.

Com o envelhecimento, os hepatócitos (células parenquimatosas do fígado responsáveis pela maioria das funções hepáticas) têm as enzimas mitocondriais reduzidas, como a óxido nítrico sintase mitocondrial e a SOD de manganês. Tais hepatócitos senescentes liberam citocinas que contribuem para a inflamação relacionada à idade, assim como aumentam o acúmulo de gotículas de lipídios, diminuem a capacidade de oxidação mitocondrial e aumentam a produção de ERO's. O estresse oxidativo associado à idade inibe a ativação das células progenitoras do fígado, causando depleção adicional de hepatócitos e massa hepática<sup>52</sup>.

#### *1.1.2.1.3 Envelhecimento do baço*

O maior órgão imunológico secundário em mamíferos é o baço; hospeda macrófagos, células dendríticas, células plasmáticas e um quarto dos linfócitos do

corpo e está envolvida em várias funções, como ativação de células T e B em resposta a antígenos sanguíneos, produção de anticorpos ou eliminação de células apoptóticas circulantes (contribuindo assim à tolerância imunológica periférica)<sup>54</sup>.

O baço possui dois tecidos funcional e histologicamente distintos onde esses processos ocorrem: a polpa branca e a polpa vermelha. A polpa branca possui uma grande massa de tecido linfóide que produz anticorpos contra antígenos reconhecidos, enquanto a polpa vermelha possui uma estreita rede de sinusóides chamada cordão de Billroth que auxilia na filtração do sangue<sup>55</sup>. A polpa branca constituída por tecidos linfóides, consistem em células T, principalmente na bainha linfóide periarteriolar, e células B, principalmente no centro germinativo. A zona marginal circunda a polpa branca e atua como uma interface separando a polpa branca da polpa vermelha. Os macrófagos constituem a principal população de células imunes dentro da zona marginal e polpa vermelha. As células do estroma também são distribuídas dentro da zona marginal e nas regiões da polpa branca e vermelha para apoiar a localização de diferentes subconjuntos de células imunes. Como órgão linfóide estruturalmente sofisticado e multifuncional, o baço exerce importantes efeitos nas respostas imunes locais e sistêmicas, com potencial de afetar diferentes tecidos e órgãos<sup>56</sup>.

Funcionalmente, o papel fisiológico primário do baço é a filtração e processamento de células sanguíneas senescentes (predominantemente eritrócitos ou hemácias) e ajuda imunologicamente a proteger contra microorganismos encapsulados e a resposta a patógenos infecciosos. Ele contém elementos hematopoiéticos e linfopoiéticos, fornecendo uma base para a hematopoiese extramedular quando necessário. Como o maior filtro de sangue do corpo, ajuda a remover eritrócitos antigos da circulação, auxiliando na remoção de microorganismos transmitidos pelo sangue. O baço é um local direto e indireto de toxicidade potencial que pode surgir secundariamente de processos de doenças ou infecções subjacentes<sup>55</sup>.

Por ser composto de tecido linfocítico, elementos circulatórios e células fagocíticas mononucleares, o baço também desempenha um papel importante tanto na resposta imune inespecífica quanto específica. Além disso, ele serve como reservatório para células sanguíneas circulantes, especialmente plaquetas, e também produz células sanguíneas durante o desenvolvimento fetal e em certos distúrbios hematológicos. A destruição dos glóbulos vermelhos dentro dos cordões esplênicos

libera ferro na circulação, que é reciclado e usado para fabricar novos eritrócitos na medula óssea. Em várias doenças hematológicas não malignas, as células revestidas com anticorpos são eliminadas da circulação pelas células fagocíticas do baço<sup>57</sup>.

O processo de envelhecimento está associado a uma inflamação crônica de baixo grau e ao acúmulo de células senescentes nos tecidos. As células senescentes exibem um fenótipo pró-inflamatório que estimulam a geração de células supressoras derivadas de mieloides, aumentando a mielopoiese na medula óssea e no baço. Mielopoiese aumentada e nível aumentado de células supressoras derivadas de mieloides foram observados na medula óssea, sangue e baço de camundongos com tumor e idosos. As células supressoras derivadas de mieloides estimulam a atividade de células T reguladoras imunossupressoras (Tregs), mas também aumentam a expressão de enzimas catabolizantes de aminoácidos e a secreção de citocinas anti-inflamatórias, por exemplo, IL-10 e TGF- $\beta$ , e ERO's<sup>58</sup>.

#### *1.1.2.1.6 Envelhecimento do coração*

O coração é altamente sensível ao processo de envelhecimento. O envelhecimento cardíaco é um processo intrínseco que resulta no comprometimento da função cardíaca, juntamente com alterações celulares e moleculares. O distúrbio estrutural e funcional dentro do coração e das artérias que se manifesta claramente no contexto das doenças cardiovasculares tem um papel preeminente no distúrbio generalizado dentro do organismo que acompanha a idade avançada, porque o sistema cardiovascular é crucial para a sobrevivência de outros sistemas orgânicos<sup>59</sup>.

Com o avanço da idade, as paredes do ventrículo esquerdo aumentam em espessura, em grande parte por causa de um aumento no tamanho dos miócitos ventriculares e um aumento na impedância vascular, e isso ajuda a moderar o aumento na tensão da parede do ventrículo esquerdo. A densidade e a função do receptor muscarínico cardíaco também diminuem com o aumento da idade e podem contribuir para a redução da variabilidade da frequência cardíaca e da atividade barorreflexa observada em idosos. Os processos que levam a alterações estruturais e funcionais celulares e estruturais da parede arterial, associadas à idade, são impulsionados por um microambiente pró-inflamatório e inflamação de baixo grau, mediado por fatores mecânicos e humorais. Esses processos ainda são impulsionados pelo estresse oxidativo<sup>60</sup>.

O envelhecimento também afeta a resposta cardíaca ao estresse. No nível molecular, o processo de envelhecimento está associado ao acúmulo de proteínas e organelas danificadas, parcialmente devido a defeitos nos sistemas de controle de qualidade das proteínas. O acúmulo de mitocôndrias disfuncionais e anormais é uma importante característica fisiopatológica do processo de envelhecimento, que está associada à produção excessiva de ERO's<sup>61</sup>.

O coração tem metabolismo bastante aeróbio e é altamente dependente da função mitocondrial, uma vez que as mitocôndrias geram mais de 90% do ATP intracelular consumido pelos cardiomiócitos. Estudo tem apontado a relevância das mitocôndrias e do estresse oxidativo tanto no envelhecimento do coração quanto no desenvolvimento de doenças cardíacas<sup>62</sup>.

Assim como em outros tecidos, os principais locais de geração de ERO's nas mitocôndrias de cardiomiócitos estão localizados na cadeia de transporte de elétrons. Em condições fisiológicas, uma quantidade variável de oxigênio é convertida em  $O_2^-$  devido ao vazamento de elétrons principalmente dos complexos I e III. As SODs convertem  $O_2^-$  em  $H_2O_2$ , que será posteriormente neutralizado em  $O_2$  e  $H_2O$ . Além disso,  $H_2O_2$  pode ser convertida no radical  $OH^-$ , altamente reativo através de Fenton e Haber- Reações de Weiss na presença de ferro. Curiosamente, o conteúdo de ferro mitocondrial aumenta com o envelhecimento em diferentes tecidos, incluindo o miocárdio, o que pode exacerbar a geração de  $OH^-$  e, portanto, o dano oxidativo. A produção contínua de  $O_2^-$  na mitocôndria leva a níveis aumentados de danos oxidativos às proteínas mitocondriais, lipídios e DNA em organismos envelhecidos. A frequência de mutações e deleções pontuais do mtDNA é aproximadamente 3 vezes maior no coração de camundongos idosos em comparação com animais jovens<sup>62</sup>.

O aumento de ERO's e o acúmulo de proteínas e organelas danificadas no coração também ocorrem na presença de hipertensão e anormalidades metabólicas, que facilitam a senescência no coração<sup>5</sup>.

Os corações envelhecidos exibem ainda características histológicas únicas. Aumentos de apoptose e necrose, proliferação de núcleos de miócitos, aumento do volume de miócitos e acúmulo de tecido conjuntivo são frequentemente observados no miocárdio de animais idosos<sup>63,64</sup>.

### 1.1.2.1.7 Envelhecimento do músculo esquelético

O músculo esquelético é um tecido com alta susceptibilidade ao processo de envelhecimento, afetado por alterações progressivas e deletérias associadas à desorganização estrutural e funcional inerente à senescência<sup>65</sup>.

O envelhecimento está associado a déficits de força relacionados à fragilidade, perda de independência e deficiência física<sup>26</sup>. A perda de força muscular relacionada à idade é conhecida como dinapenia, que leva ao comprometimento funcional do sistema muscular esquelético e está associada à diminuição do desempenho físico, enquanto a perda de massa muscular esquelética é referida como sarcopenia, cuja etiologia pode ter fatores genéticos, fisiológicos e ambientais. Ambas as condições estão relacionadas à redução do desempenho muscular, levando à intolerância ao exercício e comportamentos sedentários<sup>66</sup>.

O homem começa a sofrer uma perda lenta e progressiva da massa muscular esquelética com o envelhecimento, que é substituída, em grande parte, por tecido conjuntivo fibroso e tecido adiposo. Em parte, esse declínio é decorrente da redução nos níveis de atividade. Além da perda da massa muscular e diminuição da força máxima, ocorre redução dos reflexos musculares e perda da flexibilidade, associado a um aumento relativo de fibras oxidativas lentas que parece ocorrer. Isso pode ser atribuído à atrofia de outros tipos de fibras ou à sua conversão em fibras oxidativas lentas. Se este é um efeito do próprio envelhecimento ou se reflete, principalmente, a atividade física mais limitada de pessoas idosas, permanece incerto<sup>23</sup>.

Vários fatores contribuem para a sarcopenia, como mudanças em uma variedade de hormônios, onde essas alterações hormonais podem afetar os processos anabólicos e catabólicos no músculo esquelético. As concentrações reduzidas de androgênio e estrogênio diminuem a massa e a força muscular. Além disso, estudos sugerem que a sarcopenia é um estado inflamatório impulsionado por citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo. O estresse oxidativo modula a expressão de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF-κB), que potencializa as vias proteolíticas e aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias. O fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) prejudica a síntese de proteínas no músculo esquelético, alterando o início da tradução, o que pode contribuir para a sarcopenia<sup>23</sup>.

Com o avançar da idade, a produção de espécies reativas de oxigênio aumenta nos tecidos musculares, o que causa uma elevação contínua do estresse oxidativo no músculo. Esse estresse oxidativo traz danos pela oxidação de componentes celulares, como lipídios, proteínas e DNA. Evidências crescentes sugerem que o estresse oxidativo afeta o metabolismo energético, a degradação de proteínas e a apoptose no músculo por meio da regulação transcricional e pós-tradução de proteínas-chave, o que resulta em perda de massa muscular e disfunção metabólica<sup>67</sup>.

Por consumir grandes quantidades de oxigênio, os músculos esqueléticos podem gerar grande quantidade de ERO's, cujo acúmulo é considerado um determinante comum na perda tanto da quantidade quanto da qualidade muscular, por diversos mecanismos. Em primeiro lugar, com o avançar da idade, as defesas antioxidantes são comprometidas e o acúmulo de ERO'S induz modificações pós-transcricionais, que podem ser usadas como biomarcadores de estresse oxidativo, como a nitração e nitrosilação, carbonilação e glicação. Em segundo lugar, as ERO's contribuem para a sarcopenia também aumentando a proteólise e diminuindo a síntese de proteína muscular, levando a uma redução na quantidade de massa muscular. Por outro lado, vários mecanismos, atuando na junção neuromuscular, estão envolvidos na redução da qualidade e força muscular mediada por ERO's. Primeiro, as ERO's reduzem a liberação de acetilcolina na fenda sináptica, o que pode levar a uma falha na geração de um potencial de ação pelo sarcolema. Além disso, o estresse oxidativo persistente pode alterar a morfologia da junção neuromuscular causando redução na inervação e no número de fibras. Ao mesmo tempo, o dano de ERO's prejudica o acoplamento excitação-contração, levando a uma menor liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático. Finalmente, ERO's induzem modificação nas estruturas de actina e miosina, reduzindo significativamente o ciclo da ponte cruzada dentro do aparelho miofibrilar<sup>68</sup>.

Em condições normais, os músculos esqueléticos mais velhos são mais suscetíveis à produção de ERO'S do que músculos jovens. Essa observação é importante porque essas espécies podem aumentar a taxa de oxidação de proteínas e lipídeos, bem como levar à oxidação do DNA. Além disso, os músculos esqueléticos mais velhos são mais susceptíveis ao impacto e aos consequentes processos inflamatórios que podem modificar a homeostase intracelular oxidante-antioxidante<sup>69</sup>.

Pelos aspectos abordados, o estresse oxidativo surge como um dos mecanismos envolvidos na patogênese do envelhecimento muscular. Assim, níveis transitoriamente aumentados de dano oxidativo podem refletir um processo potencialmente promotor de saúde, enquanto um acúmulo descontrolado pode ter implicação patológica<sup>70</sup>.

### 1.1.3 Definição de sepse e aspectos epidemiológicos

Mais da metade de todos os casos de sepse nos Estados Unidos ocorre em adultos com mais de 65 anos. A incidência, gravidade da doença e mortalidade associadas à sepse são desproporcionalmente altas entre os idosos, onde o risco relativo (RR) de desenvolver sepse é 13,1 vezes maior em idosos (intervalo de confiança de 95% (IC), 12,6 a 13,6) em comparação com aqueles com menos de 65 anos de idade, e os idosos têm 1,56 vezes mais probabilidade de morrer de sepse (95% CI, 1,52-1,61)<sup>71</sup>.

A sepse é uma síndrome altamente complexa e letal com manifestações clínicas altamente heterogêneas que dificultam sua detecção e tratamento. É também um dos maiores e mais urgentes desafios de saúde pública global. O consenso internacional atual define sepse como uma disfunção orgânica com risco de vida, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção<sup>72</sup>.

Não existem testes padrão-ouro ou critérios diagnósticos para detectar pacientes com sepse. Na suspeita clínica de infecção, o diagnóstico precoce da sepse é crucial para redução da mortalidade. Para isso sugerem-se o uso de critérios rápidos do sistema de pontuação de disfunção orgânica (qSOFA; do inglês *quick Sequential Organ Failure Assessment Score*). O escore qSOFA consiste em três variáveis clínicas: alteração mental, pressão arterial sistólica menor que 100 mmHg (milímetros de mercúrio) e frequência respiratória maior que 22 respirações/minuto. A pontuação varia de 0 a 3, e uma pontuação qSOFA positiva é definida como 2 ou mais pontos, o que indica a presença de sepse<sup>9</sup>.

Para a confirmação e seguimento do paciente com disfunção orgânica, passa-se a considerar a alteração de 2 pontos na pontuação total do sistema de pontuação de disfunção orgânica completo (SOFA; do inglês *Sequential Organ Failure Assessment Score*). O escore SOFA foi projetado para descrever uma sequência de complicações da doença crítica e não para prever o desfecho, sendo baseado em

seis pontuações diferentes, uma para cada um dos sistemas: respiratório, cardiovascular, hepático, de coagulação, renal e neurológico, cada uma pontuada de 0 a 4 com uma pontuação crescente refletindo piora da disfunção orgânica, ou seja, mais órgãos estão lesionados pela resposta inflamatória exacerbada<sup>73</sup>.

Em se tratando de características epidemiológicas, as altas taxas de incidência e de mortalidade de sepse não mudaram nas últimas décadas levando a OMS a incluir a sepse nas prioridades de saúde mundial<sup>74</sup>. Nos Estados Unidos, a incidência de sepse é de 300 casos a cada 100.000 habitantes, onde  $\frac{1}{4}$  dos pacientes que são hospitalizados acabam falecendo, sendo a maior causa de morte em unidades de terapia intensiva (UTIs) não cardíacas<sup>75</sup>. Nos pacientes que evoluem para choque séptico, a mortalidade é de aproximadamente 50%. Outro estudo norte-americano observou um aumento na incidência de sepse nos últimos anos devido ao envelhecimento da população, doenças crônicas associadas, uso de imunossupressores, transplantes, quimioterapias e procedimentos invasivos<sup>76</sup>.

No Brasil, foi conduzida a pesquisa BASES (Brazilian Sepsis Epidemiological Study) entre maio de 2001 e janeiro de 2002 onde incluiu 1.383 indivíduos diagnosticados com sepse, os quais foram admitidos em três UTIs paulistas e em duas unidades catarinenses. Os dados obtidos indicaram elevada incidência da doença – aproximadamente, 57 casos a cada 1000 atendidos diariamente – além de altas taxas de mortalidade, em torno de 34% para sepse e 47% para sepse grave<sup>77</sup>.

De acordo com o relatório nacional elaborado pelo Instituto Latino Americano de Sepse e publicado em julho de 2015, envolvendo indivíduos sépticos admitidos em 116 centros de atendimentos desde o ano de 2005, exatamente 27.854 pessoas foram diagnosticadas com a doença, com predominância do gênero masculino (51,7%) e indivíduos entre a fase adulta e idosos ( $61,1 \pm 21,6$  anos). Dentre o total avaliado, 61% dos indivíduos apresentaram sepse grave e a taxa de mortalidade encontrada foi de 43,9%<sup>78</sup>.

Um estudo mais recente, SPREAD (Sepsis Prevalence Assessment Database), relatou uma incidência de sepse em UTIs de 36.3/1000 pacientes-dia com mortalidade de 55,7%. Neste estudo, a elevada mortalidade esteve associada à baixa disponibilidade de recursos e à terapia utilizada. O mesmo estudo mostra que na região Sul do Brasil a taxa de mortalidade chega a 57,8%<sup>79</sup>.

Além da elevada prevalência e morbiletalidade, os custos diretos estimados em pacientes com sepse são cerca de seis vezes maiores quando comparados a

pacientes sem sepse, constituindo um preocupante problema para os serviços de saúde, em particular nos países em desenvolvimento<sup>75</sup>. Sogayar et al. 2008, descreveram em um estudo prospectivo com 524 pacientes com sepse em 21 UTIs localizadas em hospitais públicos e privados do Brasil, um custo médio total de US\$ 9.632,00 por paciente, sendo estes significativamente mais elevados em pacientes que evoluíram a óbito<sup>80</sup>.

Mesmo com os avanços na antibioticoterapia e no manejo de cuidados intensivos da sepse, a falência de múltiplos órgãos com morbidade e mortalidade continua elevada, sendo que os piores resultados estão associados ao envelhecimento<sup>81</sup>. Embora avanços significativos tenham sido feitos em emergência e cuidados intensivos, a mortalidade pode variar de 12,1 a 25,6% na sepse grave a 30 a 50% no choque séptico. O aumento da idade é um fator de risco independente para sepse grave e mortalidade relacionada. A residência em lar de idosos, um provável marcador de fragilidade e múltiplas comorbidades, também foi associada a um risco aumentado de sepse grave e morte em idosos, sendo que as infecções respiratórias, infecções da corrente sanguínea e infecções geniturinárias são as causas subjacentes mais comuns de sepse em idosos<sup>71</sup>.

Apesar do elevado investimento financeiro, a mortalidade decorrente da sepse se apresenta em altos índices e os resultados terapêuticos continuam insuficientes<sup>73</sup>; assim, a busca no entendimento da fisiopatologia da doença e abordagem terapêutica possui grande importância<sup>82</sup>.

#### **1.1.4 Fisiopatologia da sepse**

Nas últimas décadas, pesquisas substanciais aumentaram a compreensão da fisiopatologia da sepse. Se sabe que a resposta imune frente ao agente infeccioso induz uma grave disfunção macro e microcirculatória que leva a uma hipoperfusão global profunda, causando lesões em múltiplos órgãos. Conseqüentemente, pacientes com sepse podem apresentar disfunção de praticamente qualquer sistema, independentemente do local da infecção. Os órgãos mais frequentemente afetados são rins, fígado, pulmões, coração, sistema nervoso central e sistema hematológico. Essa falência de múltiplos órgãos é a marca registrada da sepse e determina o curso do paciente desde a infecção até a recuperação ou morte<sup>72</sup>.

Uma outra fase ainda mais grave na evolução da sepse é chamada de choque séptico. Nessa fase o paciente encontra-se em estado de hipotensão persistente após a reposição volêmica. Os critérios para essa classificação são, necessidade do uso de vasopressores para manter a pressão arterial média igual ou superior a 65mmHg, associado ao aumento dos níveis de lactato sérico acima de 18 mg/dL, independente do volume de reposição volêmica. Pacientes com esta clínica tem um acréscimo de 40% na mortalidade hospitalar<sup>83</sup>.

A patogênese da sepse inclui infecção por bactérias gram-negativas e gram-positivas, fungos ou ambos; resposta inflamatória exacerbada; hipotensão, com potencial para causar choque vasodilatador; e menor entrega de oxigênio aos tecidos devido ao comprometimento da utilização de oxigênio pelas células. Esse comprometimento possui relação com a formação das espécies reativas como NO, ONOO<sup>-</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e o radical OH<sup>-</sup>. Além disso, a superprodução de NO devido à atividade da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) tem sido associada a efeitos prejudiciais, como vasodilatação geral e hipo-responsividade a agentes vasoconstritores terapêuticos<sup>84</sup>.

O desequilíbrio oxidativo foi demonstrado em vários estudos de sepse. Takeda et al, em um estudo inicial, encontraram um nível elevado de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico em pacientes sépticos, sugerindo aumento da peroxidação lipídica. Níveis diminuídos de antioxidantes também foram detectados. Cowley et al, descobriram que os sobreviventes da sepse tinham maior potencial antioxidante do que os não sobreviventes e também que ele foi rapidamente aumentado para níveis normais ou supranormais. Em dois outros estudos observacionais prospectivos, a capacidade antioxidante total foi correlacionada com o escore do Sistema de Classificação de Fisiologia Aguda e Saúde Crônica II (APACHE II do inglês: *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*) e a presença de uma maior deficiência antioxidante correlacionada com mortalidade. Esta deficiência foi fortemente indicada por dois marcadores, níveis de GSH e atividade CAT em eritrócitos, e persistiu no tempo. Níveis mais baixos de vitamina C no plasma foram detectados em pacientes com falência de múltiplos órgãos. Os mecanismos prejudiciais do aumento do nível de oxidantes na sepse incluem a modificação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos que contribuem para a lesão celular e disfunção endotelial. Além disso, o comprometimento do glicocálice e das junções celulares

entre as células endoteliais leva ao aumento da permeabilidade vascular, uma pedra angular do desenvolvimento da sepse<sup>85</sup>.

A falência de órgãos induzida pela sepse é multifatorial, pois há uma interação entre o patógeno e o sangue em nível microcirculatório. A fisiopatologia da sepse inclui função prejudicada de células epiteliais, células endoteliais e células do sistema imunológico. Durante a disfunção orgânica ocorrida na sepse, a superprodução de oxidantes é um dos fatores que contribuem para a toxicidade celular e, em última instância, para a falência e mortalidade dos órgãos. Mecanismos deletérios de aumento do nível de oxidantes na sepse incluem modificação de proteínas, peroxidação lipídica contribuindo para dano celular e disfunção endotelial. As ERO's são produzidas principalmente pelo complexo fagocítico NADPH oxidase ativado durante a fagocitose. ERO's importantes na patogênese da sepse incluem o  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  e  $OH^-$ . Estudo relatou que o nível de MPO no plasma estavam aumentados em pacientes com sepse. No entanto, as atividades plasmáticas de SOD e CAT foram significativamente atenuadas nos pacientes com sepse em comparação com os controles. Além disso, foi observada relação inversa entre enzimas antioxidantes (SOD e CAT) e avaliação de falência de órgãos (SOFA), escore fisiológico (APACHE II), marcadores específicos de toxicidade de órgão, conforme demonstrado pelo coeficiente de correlação de Pearson. Este estudo destaca que o desequilíbrio entre oxidante e antioxidante desempenha um papel fundamental na gravidade da sepse e aponta ainda que há uma deficiência de antioxidantes em pacientes não sobreviventes com sepse grave e em sobreviventes de sepse um aumento do nível de antioxidantes<sup>86</sup>.

Em um estudo anterior, que comparou a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) e o dano em estruturas cerebrais desenvolvidas pelo estresse oxidativo de ratos jovens e velhos 24h após a indução da sepse por CLP, os achados indicam que o envelhecimento potencializou a permeabilidade BHE na sepse, assim como o dano nas estruturas cerebrais do estudo<sup>87</sup>.

Na fisiopatologia da sepse, há envolvimento de respostas geradas pela inflamação exacerbada, como isquemia tecidual, lesão citopática por mediadores inflamatórios e ERO's. Desse modo, ocorre lesão endotelial difusa, trombose microvascular, ruptura das junções das células endoteliais gerando dano tecidual e orgânico. A combinação desses mecanismos contribui para a disfunção orgânica<sup>88</sup>.

### 1.1.5 Disfunção de órgãos na sepse

A conferência de consenso de definições de sepse patrocinada pelo *American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine* identificou a entidade da síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (MODS) como a presença de alteração da função orgânica em pacientes sépticos agudamente enfermos, de modo que a homeostase não pode ser mantida sem intervenção. Existem várias pontuações para avaliar a gravidade dos danos ao sistema de órgãos. A pontuação predominante no uso atual é o SOFA, além dos escores da APACHE versão II e III, escore de disfunção de múltiplos órgãos (MOD) e escore de disfunção orgânica logística (LOD) são apenas alguns exemplos<sup>89</sup>.

Em determinados pacientes, embora ocorra o controle dos microrganismos no foco infeccioso, por diferentes motivos a resposta imune se torna descontrolada, e os mediadores químicos que deveriam ter ação local, passam a gerar resposta sistêmica que levam à disfunção orgânica, o que caracteriza a sepse<sup>90</sup>. A liberação *in locu* de citocinas pró-inflamatórias, como a pró-interleucina IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e a interleucina-6 (IL-6), é muito importante para o estímulo do recrutamento de leucócitos para o foco infeccioso, onde acontece a fagocitose, com liberação de radicais livres, processo este importante para o controle dos patógenos. Todavia, na sepse, mesmo ocorrendo o controle dos microrganismos no local inicial da infecção, a resposta inflamatória gerada pelo hospedeiro é capaz de causar dano tecidual em órgãos diferentes do acometido pela infecção<sup>91</sup>.

A maioria das bacteremias não evolui para sepse: as bactérias são eliminadas da corrente sanguínea. O oxigênio liberado pelos eritrócitos e a imunidade humoral matam as bactérias na corrente sanguínea. A sepse se desenvolve se as bactérias são resistentes à oxidação e proliferam nos eritrócitos. As bactérias provocam a liberação de oxigênio dos eritrócitos para o sangue arterial. A liberação abundante de oxigênio para o plasma desencadeia uma cascata de eventos que causam: 1. falha no fornecimento de oxigênio para as células; 2. oxidação dos componentes do plasma que prejudica a regulação humoral e inativa os complexos imunes; 3. coagulação intravascular disseminada e falência de múltiplos órgãos<sup>92</sup>.

A resposta imune induz uma grave disfunção macro e microcirculatória que leva a uma hipoperfusão global profunda, causando lesões em múltiplos órgãos. Consequentemente, pacientes com sepse podem apresentar disfunção de

praticamente qualquer sistema, independentemente do local da infecção. Essa falência de múltiplos órgãos é a marca registrada da sepse e determina o curso do paciente desde a infecção até a recuperação ou morte<sup>72</sup>.

A pedra angular dos danos aos órgãos induzidos pela sepse é a instauração e perpetuação de uma incompatibilidade entre a perfusão e os requisitos metabólicos dos tecidos. Diversas alterações ocorrem simultaneamente no leito vascular sistêmico em pacientes com sepse, a permeabilidade capilar é aumentada, comprometendo o volume vascular efetivo e, portanto, a perfusão sistêmica. No choque séptico o músculo liso vascular não consegue se contrair com o estímulo neuro-hormonal, resultando em uma profunda vasodilatação arterial e venosa sistêmica que reduz o gradiente de pressão necessário para o retorno venoso e, subseqüentemente, diminui o débito cardíaco. A disfunção endotelial induzida por inflamação parece estar associada a uma superexpressão da iNOS. A subseqüente produção excessiva de NO induz diretamente ao relaxamento e hiperpolarização das células musculares lisas vasculares, evitando sua resposta a vasoconstritores e, portanto, perpetuando a hipotensão<sup>72</sup>.

A hipotensão arterial é a característica mais comum de disfunção cardiovascular em pacientes com sepse. Os principais fatores que contribuem para a fisiopatologia de hipotensão arterial são hipovolemia, redução do tônus vascular e depressão miocárdica, que pode ser grave e está associado a diminuições globais nas frações de ejeção ventricular direita e esquerda. A apresentação clínica predominante em pacientes com disfunção cardiovascular associada à sepse é a baixa tolerância à administração de fluidos, que está associada a baixa saturação do oxigênio venoso central<sup>93</sup>.

Após a ressuscitação de volume ou iniciação de vasopressores, o retorno venoso aumenta e os pacientes entram em um perfil hiperdinâmico caracterizado por alto débito cardíaco e baixa resistência vascular sistêmica. Essa resposta, entretanto, é frequentemente acompanhada por uma função miocárdica deprimida. Citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e IL-6, deprimem a contratilidade dos cardiomiócitos e induzem a expressão da molécula-1 de adesão de células vasculares (VCAM-1) no endotélio coronário, que medeia infiltração de neutrófilos no miocárdio. É importante ressaltar ainda que o NO exacerba a disfunção mitocondrial, diminuindo a utilização de oxigênio do miocárdio, perpetua a liberação de citocinas pró-inflamatórias e diminui a regulação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos<sup>72</sup>.

Alterações na microcirculação têm um papel importante na perpetuação da lesão do órgão, mesmo após a restauração das anormalidades hemodinâmicas. Vários mecanismos podem explicar essa falha microcirculatória. A disfunção endotelial e a superexpressão da lesão da iNOS não são homogêneas em todos os órgãos, causando desvio do fluxo e hipoperfusão nos tecidos subexpressos. Esta situação é agravada pela oclusão dos vasos terminais da circulação devido à diminuição da deformabilidade dos eritrócitos induzida pela sepse, maior agregabilidade plaquetária e formação de microtrombos. Além disso, o NO tem um papel fundamental no comprometimento da utilização do oxigênio celular. Independentemente da restauração da perfusão tecidual adequada ou do fornecimento de oxigênio, o NO inibe a respiração mitocondrial ao interromper a cadeia respiratória, que esgota o ATP e causa disfunção celular e lesão de órgãos<sup>72</sup>.

A sepse afeta o pulmão de forma indireta. A infecção sistêmica precipita respostas inflamatórias globais com elevações de citocinas e quimiocinas circulantes e teciduais, bem como o recrutamento e a proliferação de células leucocíticas para os tecidos afetados. A lesão causada pelo agente infeccioso combinada com a resposta do corpo a ele cria um estresse oxidativo maciço, muitas vezes levando à síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), episódios de hipóxia e a necessidade de suporte respiratório e terapias de oxigênio elevadas<sup>41</sup>.

No pulmão a sepse é a causa mais comum da SDRA e 40% dos pacientes com sepse ou choque séptico a desenvolvem. A SDRA é caracterizada por uma insuficiência respiratória aguda com infiltrados pulmonares difusos causados por lesão alveolar e um aumento da permeabilidade vascular pulmonar a fluidos ricos em proteínas. Embora sua etiologia ainda não seja totalmente compreendida, estudos têm mostrado que esta lesão da barreira alveolar é mediada por citocinas pró-inflamatórias - como TNF- $\alpha$  ou IL-1 $\beta$  - a disfunção da barreira endotelial disseminada, ativação plaquetária com microtrombos formação e formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos. Este edema e dano alveolar aumentam o espaço morto fisiológico, prejudicando as trocas gasosas e causando hipoxemia e hipercapnia graves. A gravidade do quadro é avaliada pela relação entre a pressão parcial de oxigênio arterial e a fração inspirada de oxigênio ( $PaO_2/FiO_2$ ), bem como os parâmetros ventilatórios mecânicos exigidos pelo paciente. A mortalidade entre aqueles com SDRA é alta, variando de 35 a 46%. Além disso, aqueles com SDRA relacionada à

sepsis apresentam maior mortalidade em 60 dias do que aqueles com SDRA causada por qualquer outro motivo<sup>72</sup>.

A hipoxemia é evidenciada clinicamente como hiperventilação, que pode levar a uma baixa PaCO<sub>2</sub>. A alcalose respiratória resultante pode ser ampliada se houver também acidose metabólica<sup>93</sup>.

A inflamação e o estresse oxidativo são mecanismos críticos que contribuem para a lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por sepsis. In vivo, um modelo de LPA induzido por CLP foi estabelecido em ratos onde foi observado um aumento induzido por sepsis na permeabilidade endotelial pulmonar, na atividade da MPO nos tecidos pulmonares, na produção de fatores inflamatórios séricos e no acúmulo de células inflamatórias no fluido de lavagem broncoalveolar. Além disso, houve uma diminuição na SOD pulmonar e aumento nos níveis de dano em lipídios pulmonar nos ratos CLP comparados aos ratos CLP que receberam tratamento com um possível antioxidante<sup>94</sup>.

O sistema renal é outro alvo comum da disfunção orgânica progressiva provocada pela sepsis. A sepsis é o fator contribuinte mais comum para lesão renal aguda (LRA) em pacientes gravemente enfermos, e mais da metade dos pacientes com sepsis ou choque séptico a desenvolve. A LRA é definida como um aumento da creatinina sérica  $\geq 0,3$  mg/dl em 48 horas, aumento de 50% da linha de base em 7 dias ou débito urinário  $<0,5$  ml/kg/h por mais de 6 horas. Pacientes com LRA associada à sepsis têm 62% e 36% maior risco de mortalidade hospitalar em comparação com aqueles com sepsis sem LRA e aqueles com LRA não associada à sepsis, respectivamente<sup>95</sup>.

A hipoperfusão renal levando à necrose tubular aguda tem sido o paradigma na sepsis, mas as evidências atuais sugerem um papel ainda mais importante da microcirculação local e dos sinais inflamatórios, incluindo lesão de isquemia-reperfusão, estresse oxidativo e apoptose tubular. Além disso, o tratamento da sepsis também pode contribuir para a LRA pelo uso de drogas nefrotóxicas e ressuscitação fluida excessiva ou menos fisiológica. A sobrecarga de volume aumenta a pressão venosa central, o que também aumenta a pressão vascular renal, causando edema de órgão subsequente, aumento da pressão intracapsular e diminuição da taxa de filtração glomerular<sup>72</sup>.

A disfunção renal na sepsis se apresenta clinicamente como oligúria que geralmente é secundário ao choque séptico. Outros fatores também podem contribuir

para a disfunção renal, incluindo efeitos adversos de antibióticos nefrotóxicos (por exemplo, aminoglicosídeos) ou exposição a corantes de contraste que são usados para imagens. Aumentos na uréia sérica (ou nitrogênio da uréia sanguínea) e creatinina são comuns, e até mesmo um pequeno aumento na concentração de creatinina está associada a piores desfechos em pacientes criticamente enfermos<sup>93</sup>.

Além dos órgãos até o momento citados e o seu envolvimento na fisiopatologia da sepse, o fígado está longe de ser um espectador na sepse: é um regulador do processo inflamatório e um alvo da resposta do hospedeiro. A função hepática alterada na ausência de uma anormalidade estrutural hepatobiliar é comum na sepse e é relacionada aos efeitos deletérios de patógenos, toxinas e ou citocinas. As anormalidades na função hepática são refletidas principalmente por um aumento nos níveis de bilirrubina ou transaminases, embora essas substâncias possam também ser liberadas por outros órgãos, como os músculos. A lesão hepática tem um efeito substancial sobre o desfecho na sepse, devido principalmente a alterações bacterianas ou depuração de LPS, por aumentar a liberação de citocinas pró-inflamatórias que promovem disfunção de órgãos distais (como a lesão pulmonar)<sup>93</sup>.

Quando expostas a LPS, as células de Kupffer aumentam a liberação de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . Em resposta às citocinas pró-inflamatórias, os hepatócitos liberam proteínas de fase aguda (APPs) na circulação sistêmica, com efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios generalizados. Assim, foi levantada a hipótese de que os hepatócitos, via APPs, têm um papel central no equilíbrio da resposta imune na sepse, evitando um estado inflamatório excessivo ou imunossuprimido. Este papel regulador ganha importância quando se considera que até 46% dos pacientes com sepse têm disfunção hepática concomitante e tem sido associada a uma mortalidade maior em 28 dias<sup>96</sup>.

Sabendo que a sepse é uma resposta sistêmica à infecção e que pode ainda resultar em estresse oxidativo e conseqüentemente entre os alvos o dano esplênico agudo, um estudo que avaliava a ação antioxidantes e anti-inflamatórias do hidroxitirosol (HT) apontou atividades distinguidas no tecido esplênico após resposta séptica mediada por LPS. Os resultados obtidos demonstram que a administração de HT aumentou a taxa de sobrevivência dos camundongos, inibiu a incidência de dano oxidativo no tecido esplênico por meio da diminuição da lipoperoxidação e do aumento das enzimas antioxidantes, nomeadamente glutathione, SOD e CAT. A HT também

diminuiu os níveis de MPO. Além disso, a HT atenuou a infiltração de células imunes ativadas e lesão de tecido após a injeção de LPS<sup>97</sup>.

A insuficiência de órgãos vitais induzida pela sepse ameaça a sobrevivência do paciente, no entanto a recuperação a médio e longo prazo também é prejudicada pela disfunção persistente de órgãos cruciais, tradicionalmente considerados não vitais, como o músculo esquelético. A fraqueza adquirida na UTI é uma consequência clínica reconhecida da disfunção mitocondrial do músculo esquelético, que ocorre simultaneamente nos músculos respiratórios e locomotor, e que sem dúvida, contribui para pior prognóstico em médio e longo prazo em pacientes com choque séptico<sup>98</sup>.

A atrofia é uma característica clássica de uma série de doenças que afetam o músculo esquelético, variando do envelhecimento (sarcopenia) e doenças críticas como a sepse. A atrofia muscular observada através da redução da área de secção transversal da fibra muscular gera, portanto, uma redução na produção de força, que se manifesta como fraqueza muscular e capacidade reduzida de exercício<sup>99</sup>.

As citocinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , desempenham um papel importante na perda muscular também mediada pela geração de EROs. O TNF- $\alpha$  circulante elevado é um fator chave na perda significativa de proteína total ~ 16%, que ocorre ao longo de um período de 3 semanas em pacientes com sepse grave. Além disso, modelos experimentais de sepse em roedores demonstraram que a síntese de proteínas está reduzida, associada à interrupção da fosforilação da quinase s6 ribossomal de uma maneira dependente de TNF- $\alpha$ <sup>99</sup>.

### **1.1.6 Modelo animal de sepse**

Modelos animais empregados na pesquisa permitem a replicação de condições fisiopatológicas visualizadas em humanos, desempenhando um papel crucial na área científica<sup>100</sup>. Apesar de alto custo e envolver o bem estar do animal, os modelos cirúrgicos são os mais relevantes, já que uma quantidade significativa de casos de sepse é resultado de infecção adquirida durante a cirurgia invasiva<sup>101,102</sup>.

Um dos modelos utilizados é a de ligação e perfuração cecal (CLP)<sup>100</sup>, onde é feito uma ligação intestinal seguida de uma perfuração no ceco com uma agulha a modo de vaziar o material fecal na cavidade abdominal induzindo a peritonite<sup>103</sup>. A utilização de meios cirúrgicos para a indução de sepse se mostra mais relevante, pois criam um foco infeccioso específico que pode disseminar ou causar uma resposta

imune sistêmica, simulando com mais confiabilidade a fisiopatologia visualizada em humanos<sup>103,104</sup>.

Frente a isso, o modelo de indução CLP é considerado a base da pesquisa da sepse, pois o mesmo deve mimetizar a ocorrência de hipotensão, vasodilatação, função cardiovascular, resposta ao tratamento e mortalidade vistas em pacientes com sepse. Além disso, o CLP recria a liberação progressiva de mediadores pró-inflamatórios. Portanto, CLP é considerada um dos modelos clinicamente mais relevantes de sepse<sup>104</sup>.

#### 1.1.6.1 Ligação e perfuração cecal (CLP)

Para estudar a fisiopatologia da sepse, diversos modelos animais foram desenvolvidos. Sepse polimicrobiana por CLP é o modelo mais frequentemente utilizado, pois se assemelha à evolução e as características da sepse humana<sup>105</sup>.

A técnica de CLP foi implementada pelo grupo de I.H Chaudry há mais de 30 anos. Baseia-se na ligação do ceco abaixo da válvula íleo-cecal, seguido de uma perfuração do ceco, permitindo o vazamento do material fecal para a cavidade peritoneal. Subsequentemente, os animais desenvolvem sintomas típicos de sepse e com mortalidade similar ao que ocorre em UTIs<sup>105</sup>. Como o ceco exibe uma elevada carga bacteriana, a perfuração deste local resulta em peritonite polimicrobiana, translocação de bactérias para o sangue (bacteremia), choque séptico, disfunção de múltiplos órgãos e, por fim, morte<sup>106</sup>.

A técnica de CLP alcançou sua popularidade por causa de sua facilidade, reprodutibilidade e semelhança com a doença humana. Mais uma vantagem do modelo é a possibilidade de controlar a mortalidade, o grau de contaminação bacteriana, a severidade da doença, pelo ajuste do tamanho da agulha ou pela quantidade de perfurações realizadas no ceco<sup>107</sup>.

Considerando que sepse é um grande problema em UTIs com alta incidência e altas taxas de mortalidade, o modelo de CLP é uma das melhores representações da sepse humana e fez importantes contribuições para o conhecimento dos componentes inflamatórios envolvidos na sepse e na identificação de novos alvos terapêuticos. Considerado o modelo de CLP padrão ouro da sepse<sup>105</sup>.

Sendo assim, na medida que a população adulta continua a envelhecer e se transformar na população idosa, os problemas relacionados com a idade avançada

continuarão a crescer em proporções iguais, assim como o risco de infecção. Por isso são necessários estudos adicionais para avaliar a fisiopatologia da sepse nesta população especial que é comumente afetada por infecções, e assim melhor conhecer esse grupo etário, já que se trata de uma população com identificação própria, com modificações corporais desde o nível sistêmico a níveis moleculares, inevitáveis e que precisa de cuidados e atenção especial.

A sepse e o próprio envelhecimento estão relacionados ao estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial. Nas pesquisas em bancos de dados não foi encontrado pesquisas que abordassem a íntima interrelação do comprometimento das estruturas periféricas num organismo biológico atacado pela sepse e cronologicamente velho acometido das alterações intrínsecas inerentes do processo de envelhecimento.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o estresse oxidativo em múltiplos órgãos em ratos velhos comparado a jovens em modelo animal de sepse polimicrobiana por CLP.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade da mieloperoxidase em múltiplos órgãos de ratos velhos submetidos à CLP.
- Avaliar o dano oxidativo em lipídios em múltiplos órgãos de ratos velhos submetidos à CLP.;
- Avaliar o dano oxidativo em proteínas em múltiplos órgãos de ratos velhos submetidos à CLP.;
- Avaliar o nível de SOD e CAT em múltiplos órgãos de ratos velhos submetidos à CLP.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo experimental com modelo animal de sepse polimicrobiana severa em ratos adultos e ratos velhos, pelo método de CLP.

#### 3.2 ANIMAIS

Para as análises foram utilizados ratos Wistar machos adultos (02 meses, 220-310g) e velhos (07 meses, 360 – 465g)<sup>87</sup>. Os animais foram provenientes do biotério da Universidade Federal de Santa Catarina e alojados no biotério da Universidade do Sul de Santa Catarina, em caixas de polipropileno de dimensões adequadas, com maravalha, em ambiente climatizado ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com ciclo claro/escuro de 12 horas controlado por timer, recebendo água e dieta padrão *ad libitum* durante todo o período de experimento.

#### 3.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Os animais foram agrupados de acordo com a idade cronológica em grupos de ratos adultos com 02 meses (60d) e ratos velhos com 07 meses (210d)<sup>87</sup> de vida sendo que os grupos foram randomicamente subdivididos em: sham 60d, sham 210d, CLP 60d e CLP 210d, contendo n=10 por grupo experimental.

##### 3.3.1 Indução da sepse por ligação e perfuração cecal

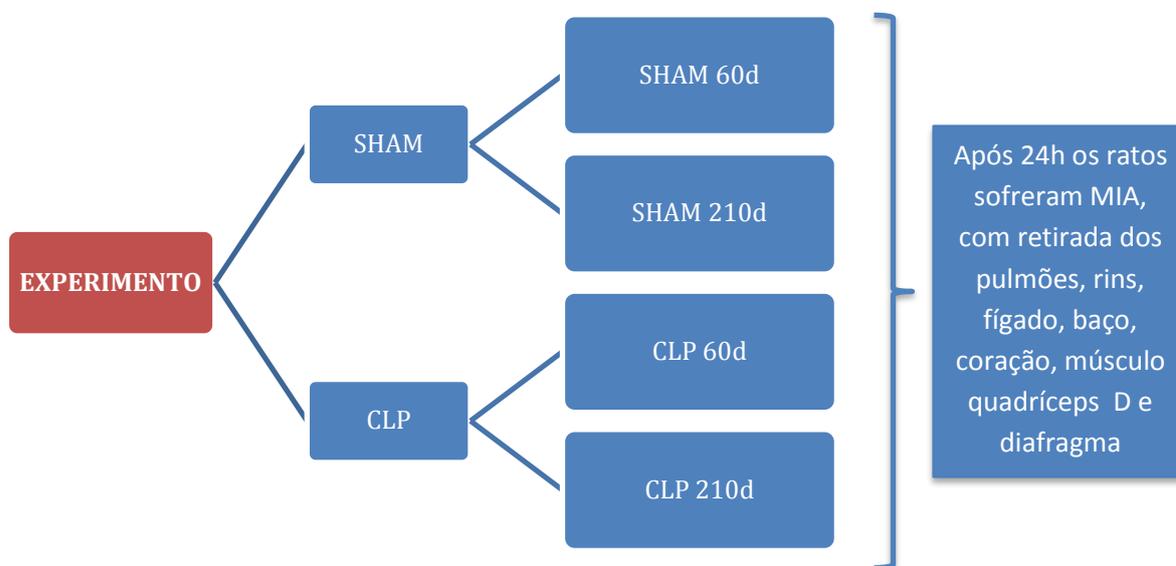
A sepse intra-abdominal foi produzida usando a técnica CLP<sup>108</sup> para indução de sepse grave<sup>109</sup>. Os ratos foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), e submetidos à laparotomia com incisão mediana abdominal. O ceco foi exposto, ligado com fio seda 3-0 na metade de seu comprimento abaixo da junção íleo-cecal, perfurado uma vez com uma agulha de calibre nº 14 e gentilmente comprimido até a extrusão de conteúdo fecal. Os planos cirúrgicos foram fechados e os ratos observados por 2 horas. Imediatamente após o procedimento, todos os grupos receberam solução salina (50 mL/kg), dipirona (80 mg/kg) e ceftriaxona (30

mg/kg) por via subcutânea (S.C.) sendo os dois últimos administrados novamente 12 horas após a cirurgia. Como controle, foram avaliados animais submetidos à laparotomia, porém sem ligação ou perfuração cecal (animais sham).

### 3.3.2 Coleta das amostras biológicas

Para coleta das amostras, após os experimentos todos os animais foram eutanasiados obedecendo as disposições da Resolução número 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), de 20/06/2002, e ocorreram de forma indolor e assistida, por overdose de tiopental (0,5 g/Kg) e decaptação por guilhotina para coleta das amostras biológicas 24 horas após CLP. Imediatamente foi iniciado o procedimento para a retirada dos pulmões, rins, fígado, baço, coração, músculo quadríceps direito e diafragma, que foram cuidadosamente dissecados, armazenados em tubos do tipo Eppendorf® e mantidos sob refrigeração em freezer - 80°C até posterior análise.

Figura 2 - Fluxograma do desenho experimental.



### 3.4 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS

#### 3.4.1 Avaliação da atividade da mieloperoxidase

A atividade da MPO foi utilizada como indicativo do infiltrado de neutrófilos tecidual<sup>110</sup>. Neste sentido, as amostras foram homogeneizadas em 0.5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e centrifugadas. A suspensão foi homogeneizada manualmente até a obtenção do sobrenadante. Uma alíquota do sobrenadante foi misturada com uma solução de 1,6 mM tetrametilbenzidina (TMB) e 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A atividade da MPO foi mensurada espectrofotometricamente em 650 nm a 37 °C. Os resultados foram expressos como mU/mg de proteína<sup>111</sup>.

#### 3.4.2 Avaliação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A formação de TBARS durante uma reação ácida de aquecimento foi utilizada como marcador de peroxidação lipídica<sup>112</sup>. Resumidamente, as amostras foram misturadas com 1 mL de ácido tricloroacético a 10% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67%, e, em seguida, aquecidas em banho de água fervente a 100 °C durante 30 minutos. TBARS foram determinadas pela absorbância a 535 nm, utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados foram expressos como equivalentes de malondialdeído (MDA)/mg de proteína.

#### 3.4.3 Avaliação da carbonilação proteica

O efeito do estresse oxidativo em proteínas foi avaliado por meio da determinação de grupos carbonil baseado na reação com dinitrofenilhidrazina. Resumidamente, as proteínas foram precipitadas por adição de ácido tricloroacético a 20% e dissolvidas em dinitrofenilhidrazina, e a absorbância foi aferida em 370 nm. Os resultados foram expressos em concentração de proteínas carboniladas/mg de proteína<sup>113</sup>.

#### **3.4.4 Determinação da atividade da superóxido dismutase**

A atividade enzimática da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina. As amostras teciduais foram homogeneizadas em 1 mL de tampão glicina e centrifugadas por 10 min em 3000 rpm, em temperatura ambiente. O reagente branco foi preparado a partir da mistura de 10  $\mu\text{L}$  de CAT na concentração de 0,0024 g/mL com 970  $\mu\text{L}$  de tampão glicina a 32 °C. Após, foi adicionada a quantidade de 17  $\mu\text{L}$  de adrenalina 60 mM. A leitura do reagente foi realizada a cada 10 segundos, durante 180 segundos, a fim de determinar a curva de calibração. Este processo foi repetido após a leitura de quatro amostras e sempre que houve a troca de reagentes. As amostras foram preparadas a partir da mistura de 10  $\mu\text{L}$  de CAT 0,0024 g/mL, 3, 5 ou 7  $\mu\text{L}$  de amostra e 970  $\mu\text{L}$  de tampão glicina a 32 °C. A leitura da amostra foi realizada a cada 10 segundos, durante 180 segundos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de lâmpada de deutério, em cubetas de plástico, a 480 nm. A atividade da SOD foi expressa em U de SOD/mg de proteína<sup>114</sup>.

#### **3.4.5 Determinação da atividade da catalase**

A atividade enzimática da CAT é diretamente proporcional à taxa de decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A reação utiliza o método que emprega  $\text{H}_2\text{O}_2$  que deve ser convertido pela CAT em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ <sup>115</sup>. As amostras teciduais foram homogeneizadas em 1 mL de tampão catalase e centrifugadas por 10 min em 3000 rpm, em temperatura ambiente. O reagente branco foi preparado a partir da mistura de 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante da amostra com 1 mL de tampão CAT e foi utilizado para zerar o espectrofotômetro. O reagente amostra foi preparado a partir da mistura de 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante da amostra com 1 mL de tampão CAT contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  (25 mL de tampão CAT e 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , protegido da luz). A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro de lâmpada de deutério, em cubetas de quartzo, a 240 nm, nos tempos 0, 30 e 60 segundos. A atividade da CAT foi expressa em U de CAT/mg de proteína.

### **3.4.6 Determinação de proteínas totais**

Os resultados das análises bioquímicas foram normalizados com a quantidade de proteínas avaliada de acordo com o método descrito por Lowry e colaboradores<sup>116</sup>.

## **3.5 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS**

A análise estatística dos dados e a elaboração dos gráficos foram realizadas no programa estatístico GraphPad Prism® versão 8. Os dados foram expressos pela média  $\pm$  desvio padrão e analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) e teste post hoc Tukey com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

## **3.6 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA**

Os experimentos foram realizados após a aprovação do protocolo pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL sob o número do protocolo (16.013.5.05.IV.) e foram realizados seguindo as diretrizes atuais para o cuidado de animais de laboratório e as diretrizes éticas para investigações de dor experimental em animais conscientes, respeitando os princípios da lei Arouca - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins científicos e didáticos - DBCA-2016 para utilização dos animais.

#### 4. ARTIGO

Nesta sessão será apresentado o artigo intitulado: “Estresse oxidativo em múltiplos órgãos após sepse em ratos velhos: um estudo pré-clínico”, que será submetido à revista *Experimental Gerontology*, com fator de impacto de 3.376 no ano de 2021, e classificação A2 no Qualis CAPES na área de Medicina II.

##### **Estresse oxidativo em múltiplos órgãos após sepse em idosos: um estudo pré-clínico**

Willian Margotti<sup>1</sup>, Mariana Pereira de Souza Goldim<sup>1</sup>, Thaina Cidreira<sup>1</sup>, Tais Luise Denicol<sup>1</sup>, Larissa Joaquim<sup>1</sup>, Lucineia Gainski Danielski<sup>1</sup>, Kiuanne Lino Lobo Metzker<sup>1</sup>, Sandra Bonfante<sup>1</sup>, Edficher Margotti<sup>1</sup>, Fabricia Petronilho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos- Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL, Tubarao, SC Brazil

\*Endereço correspondente a este autor em Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos- Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL - Santa Catarina (SC), Brasil. Tel/Fax: +55 48 3621-3363; E-mail: [fabricia.petronilho@unisul.br](mailto:fabricia.petronilho@unisul.br).

##### **RESUMO**

A proporção da população com mais de 60 anos tem aumentado em todo mundo. O envelhecimento é um processo dinâmico, no qual ocorrem modificações morfológicas e fisiológicas em todos os níveis, tornando o organismo mais vulnerável a eventos agudos. Os idosos têm maior risco de desenvolver sepse do que os mais jovens. A sepse é um conjunto de manifestações graves em todo o corpo produzidas por uma infecção, levando a alterações que comprometem a homeostase celular e podem resultar em disfunção de múltiplos órgãos. Evidências sugerem que o estresse oxidativo está intrinsecamente relacionado ao envelhecimento e a sepse. O objetivo deste estudo foi avaliar o estresse oxidativo em múltiplos órgãos em ratos velhos em modelo animal de sepse polimicrobiana. Ratos Wistar machos adultos (60d) e velhos (210d) foram submetidos à sepse por ligação e perfuração cecal (CLP) e grupo controle (sham) somente a laparotomia. Os grupos experimentais foram divididos em sham 60d, sham 210d, CLP 60d e CLP 210d. Vinte e quatro horas após a indução da sepse, a atividade da mieloperoxidase (MPO), dano oxidativo a lipídios e proteínas, atividades da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) foram avaliadas no pulmão, rim, fígado, coração, baço, quadríceps e diafragma. O envelhecimento potencializou o aumento da atividade da MPO no grupo CLP comparados aos mais jovens submetidos a CLP no pulmão, fígado e baço. O dano aos lipídios ocorreu em todas estruturas analisadas nos

grupos CLP, enquanto apenas no pulmão, fígado e diafragma a peroxidação lipídica foi maior do grupo CLP 210d em comparação com 60d. O dano em proteína essa potencialização aconteceu apenas no pulmão. A atividade da SOD nas estruturas analisadas foi diminuída em ambos os grupos CLP, sendo que no pulmão, rim, baço e diafragma houve uma diminuição significativa da SOD no grupo CLP 210d comparado ao sham 60d enquanto que na CAT somente no pulmão e rim. Os achados neste estudo apontam que o aumento da idade potencializou o dano oxidativo em diferentes órgãos alvo na sepse ao intensificar a presença de neutrófilos, o que fez possivelmente com que aumentasse o dano em lipídios e proteínas com redução da atividade da SOD e CAT.

**Descritores:** sepse, envelhecimento, estresse oxidativo, disfunção múltiplos órgãos.

### **ABSTRACT**

The proportion of the population over 60 years of age has increased worldwide. Aging is a dynamic process, in which morphological and physiological changes occur at all levels, making the body more vulnerable to acute events. Elderly people are at greater risk of developing sepsis than younger people. Sepsis is a set of serious manifestations throughout the body produced by an infection, leading to changes that compromise cell homeostasis and can result in dysfunction of multiple organs. Evidence suggests that oxidative stress is intrinsically related to aging and sepsis. The aim of this study was to evaluate multi-organ oxidative stress in old rats in an animal model of polymicrobial sepsis. Adult male Wistar rats (60d) and old (210d) were submitted to sepsis by cecal ligation and perforation (CLP) and control group (sham) only by laparotomy. The experimental groups were divided into sham 60d, sham 210d, CLP 60d and CLP 210d. Twenty-four hours after sepsis induction, myeloperoxidase (MPO) activity, oxidative damage to lipids and proteins, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities were evaluated in lung, kidney, liver, heart, spleen, quadriceps and diaphragm. Aging potentiated the increase in MPO activity in the CLP group compared to younger patients undergoing CLP in the lung, liver and spleen. Lipid damage occurred in all structures analyzed in the CLP groups, while only in the lung, liver and diaphragm the lipid peroxidation was higher in the CLP 210d group compared to 60d. The protein damage in this potentiation happened only in the lung. The SOD activity in the analyzed structures was decreased in both CLP groups, and in the lung, kidney, spleen and diaphragm there was a significant decrease in SOD in the CLP 210d group compared to the sham 60d group while in the CAT only in the lung and kidney. The findings in this study indicate that increasing age potentiated oxidative damage in different target organs in sepsis by intensifying the presence of neutrophils, which possibly increased the damage to lipids and proteins with reduced activity of SOD and CAT.

**Keywords:** sepsis, aging, oxidative stress, multiple organ dysfunction.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de mais de meio século de pesquisas, a sepse ainda constitui um grande problema na prestação de cuidados de saúde. Embora os avanços na pesquisa tenham aumentado significativamente nosso conhecimento sobre a patogênese da sepse e tenham resultado em um melhor prognóstico e melhores resultados de sobrevida, a sepse ainda permanece um grande desafio na medicina moderna, com um aumento na ocorrência prevista e uma enorme carga socioeconômica<sup>117</sup>.

Através deste trabalho, buscou-se avaliar o estresse oxidativo em múltiplos órgãos em ratos velhos comparado a jovens em modelo animal de sepse polimicrobiana por CLP. Os achados obtidos neste estudo apontam que o aumento da idade com envelhecimento potencializou o dano ocasionado pela sepse ao intensificar a presença de neutrófilos, o que fez possivelmente com que aumentasse o dano em lipídios e proteínas com a falência da efetividade da atividade da SOD e CAT, o que causou um aumento no estresse oxidativo em diferentes órgãos, sendo o pulmão o maior órgão acometido. Diante disso, este estudo contribui para a importância de compreender o estresse oxidativo frente à sepse em organismos biológicos cronologicamente velhos e fisiologicamente vulneráveis a fim de direcionar e alertar novos estudos na busca de medidas profiláticas e terapêuticas como estratégias antioxidantes que impeçam o agravo e o dano celular aos sistemas envolvidos.

## REFERÊNCIAS

1. Ganesan B, Gowda T, Al-Jumaily A, Fong KNK, Meena SK, Tong RKY. Ambient assisted living technologies for older adults with cognitive and physical impairments: A review [Internet]. Vol. 23, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. Verduci Editore s.r.l; 2019 [cited 2021 Jun 20]. p. 10470–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31841201/>
2. IBGE | Censo Agro 2017 | Número de idosos cresce 18% em 5 anos e ultrapassa 30 milhões em 2017 [Internet]. [cited 2021 Jun 20]. Available from: <https://censos.ibge.gov.br/2012-agencia-de-noticias/noticias/20980-numero-de-idosos-cresce-18-em-5-anos-e-ultrapassa-30-milhoes-em-2017.html>
3. Behnke JA, Finch CE, Moment GB. The biology of aging. 1978;(I-XII+388(February 2003):2–22.
4. Tajir K, Shimizu Y. Liver physiology and liver diseases in the elderly [Internet]. Vol. 19, *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Co; 2013 [cited 2021 Jun 20]. p. 8459–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24379563/>
5. Shirakabe A, Ikeda Y, Sciarretta S, Zablocki DK, Sadoshima J. Aging and Autophagy in the Heart [Internet]. Vol. 118, *Circulation Research*. Lippincott Williams and Wilkins; 2016 [cited 2021 Jun 20]. p. 1563–76. Available from: </pmc/articles/PMC4869999/>
6. Eilers R, Krabbe PFM, Van Essen TGA, Suijkerbuijk A, Van Lier A, De Melker HE. Assessment of vaccine candidates for persons aged 50 and older: A review. *BMC Geriatr* [Internet]. 2013 [cited 2021 Jun 20];13(1):32. Available from: </pmc/articles/PMC3668232/>
7. Rowe TA, McKoy JM. Sepsis in Older Adults [Internet]. Vol. 31, *Infectious Disease Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2017 [cited 2021 Jun 20]. p. 731–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29079157/>
8. Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression [Internet]. Vol. 14, *Nature Reviews Nephrology*. Nature Publishing Group; 2018 [cited 2021 Jun 20]. p. 121–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29225343/>
9. Song JU, Sin CK, Park HK, Shim SR, Lee J. Performance of the quick Sequential (sepsis-related) Organ Failure Assessment score as a prognostic tool in infected patients outside the intensive care unit: A systematic review and meta-analysis. *Crit Care* [Internet]. 2018 Feb 6 [cited 2021 Jun 6];22(1). Available from: </pmc/articles/PMC5802050/>
10. Sadighi Akha AA. Aging and the immune system: An overview [Internet]. Vol. 463, *Journal of Immunological Methods*. Elsevier B.V.; 2018 [cited 2021 Jun 20]. p. 21–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30114401/>
11. Kanasi E, Ayilavarapu S, Jones J. The aging population: demographics and the biology of aging [Internet]. Vol. 72, *Periodontology 2000*. Blackwell

- Munksgaard; 2016 [cited 2021 Jun 20]. p. 13–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27501488/>
12. Número de idosos no Brasil deve dobrar até 2042, diz IBGE - IAF - Instituto dos Auditores Fiscais [Internet]. [cited 2021 Jun 20]. Available from: <http://www.iaf.org.br/numero-de-idosos-no-brasil-deve-dobrar-ate-2042-diz-ibge/>
  13. Castro MHG de. Idosos e mortalidade: preocupante relação com as causas externas [Internet]. 1a Análise Seade, no 34. 2016 [cited 2021 Jun 20]. Available from: [https://www.seade.gov.br/wp-content/uploads/2016/03/Primeira\\_Analise\\_35\\_fev16.pdf](https://www.seade.gov.br/wp-content/uploads/2016/03/Primeira_Analise_35_fev16.pdf)
  14. Faverio P, Aliberti S, Bellelli G, Suigo G, Lonni S, Pesci A, et al. The management of community-acquired pneumonia in the elderly [Internet]. Vol. 25, *European Journal of Internal Medicine*. Elsevier; 2014 [cited 2021 Jun 20]. p. 312–9. Available from: </pmc/articles/PMC4102338/>
  15. Tieland M, Trouwborst I, Clark BC. Skeletal muscle performance and ageing [Internet]. Vol. 9, *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. Wiley Blackwell; 2018 [cited 2021 Jun 20]. p. 3–19. Available from: </pmc/articles/PMC5803609/>
  16. Ferreira OGL, Maciel SC, Costa SMG, Silva AO, Moreira MASP. Envelhecimento Ativo e Sua Relação Com a Independência Funcional. *Texto e Contexto Enferm*. 2012 Jul;21(3):513–8.
  17. Yang J, Fernández-Galilea M, Martínez-Fernández L, González-Muniesa P, Pérez-Chávez A, Martínez JA, et al. Oxidative stress and non-alcoholic fatty liver disease: Effects of omega-3 fatty acid supplementation [Internet]. Vol. 11, *Nutrients*. MDPI AG; 2019 [cited 2021 Jun 26]. Available from: </pmc/articles/PMC6521137/>
  18. Trevisan K, Cristina-Pereira R, Silva-Amaral D, Aversí-Ferreira TA. Theories of aging and the prevalence of Alzheimer’s disease [Internet]. Vol. 2019, *BioMed Research International*. Hindawi Limited; 2019 [cited 2021 Jun 20]. Available from: </pmc/articles/PMC6601487/>
  19. da Costa JP, Vitorino R, Silva GM, Vogel C, Duarte AC, Rocha-Santos T. A synopsis on aging—Theories, mechanisms and future prospects [Internet]. Vol. 29, *Ageing Research Reviews*. Elsevier Ireland Ltd; 2016 [cited 2021 Jun 20]. p. 90–112. Available from: </pmc/articles/PMC5991498/>
  20. Kalache A, Gatti A. Active ageing: a policy framework. *Adv Gerontol*. 2003;11:7–18.
  21. dos Santos FH, Andrade VM, Bueno OFA. Envelhecimento: Um processo multifatorial. *Psicol em Estud*. 2009;14(1):3–10.
  22. Schneider RH, Irigaray TQ. O envelhecimento na atualidade: aspectos cronológicos, biológicos, psicológicos e sociais. *Estud Psicol*. 2008;25(4):585–93.
  23. Varela via R de A, Ciconelli RM, Soá cia C de, Neto NC. Avaliação de

- qualidade de vida em idosos frágeis: uso de questionários - Revisão da literatura. *Geriatr Gerontol Aging*. 2013;7(3):219–27.
24. Brivio P, Paladini MS, Racagni G, Riva MA, Calabrese F, Molteni R. From Healthy Aging to Frailty: In Search of the Underlying Mechanisms. *Curr Med Chem*. 2019 Jul 23;26(20):3685–701.
  25. Cesari M, Calvani R, Marzetti E. Frailty in Older Persons [Internet]. Vol. 33, *Clinics in Geriatric Medicine*. W.B. Saunders; 2017 [cited 2021 Jun 20]. p. 293–303. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28689563/>
  26. Leite LE de A, Resende T de L, Nogueira GM, Cruz IBM da, Schneider RH, Gottlieb MG. Envelhecimento, estresse oxidativo e sarcopenia: uma abordagem sistêmica. *Rev Bras Geriatr e Gerontol*. 2012;15(2):365–80.
  27. Barreto P de S. Atualidades sobre fragilidade no idoso e exercício físico. *Geriatr Gerontol Aging*. 2008;2(2):72–80.
  28. Wagner KH, Cameron-Smith D, Wessner B, Franzke B. Biomarkers of aging: From function to molecular biology [Internet]. Vol. 8, *Nutrients*. MDPI AG; 2016 [cited 2021 Jun 20]. Available from: </pmc/articles/PMC4924179/>
  29. Sies H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine [Internet]. Vol. 4, *Redox Biology*. Elsevier B.V.; 2015 [cited 2021 Jun 23]. p. 180–3. Available from: </pmc/articles/PMC4309861/>
  30. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. 13th ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan; 2017.
  31. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças*. 9th ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan; 2016. undefined-.
  32. Chen Z, Zhong C. Oxidative stress in Alzheimer's disease [Internet]. Vol. 30, *Neuroscience Bulletin*. Science Press; 2014 [cited 2021 Jun 23]. p. 271–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24664866/>
  33. Rogers LK, Cismowski MJ. Oxidative stress in the lung – The essential paradox [Internet]. Vol. 7, *Current Opinion in Toxicology*. Elsevier B.V.; 2018 [cited 2021 Jun 26]. p. 37–43. Available from: </pmc/articles/PMC5754020/>
  34. Cutler RG. Oxidative stress and aging: Catalase is a longevity determinant enzyme [Internet]. Vol. 8, *Rejuvenation Research*. Rejuvenation Res; 2005 [cited 2021 Jun 23]. p. 138–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16144468/>
  35. Ruivo S, Viana P, Martins C, Baeta C. Efeito do envelhecimento cronológico na função pulmonar. Comparação da função respiratória entre adultos e idosos saudáveis. *Rev Port Pneumol*. 2009 Jul 1;15(4):629–53.
  36. Sato EI, Atallah AN, Amato A, Ferreira LM, Colombo AL, Borges DR, et al. *Atualização terapêutica de Felício Cintra do Prado, Jairo de Almeida Ramos, José Ribeiro do Valle : diagnóstico e tratamento*. 26th ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 2017.

37. Fein AM, Calalang-Colucci MG. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock. *Crit Care Clin* [Internet]. 2000 [cited 2021 Jun 26];16(2):289–317. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10768083/>
38. Batista Teixeira B, Xavier C, Lamounier A, Tavares C. Hyperoxia and greater risk for bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Rev Paul Pediatr* [Internet]. 2007 [cited 2021 Jun 26];25(1):47–52. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=406038920009>
39. Andrade Júnior DR de, Souza RB de, Santos SA dos, Andrade DR de. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J Bras Pneumol*. 2005;31(1):60–8.
40. da Silva AA, Gonçalves RC. Reactive oxygen species and the respiratory tract diseases of large animals. *Cienc Rural*. 2010;40(4):994–1002.
41. Bridges CC, Zalups RK. The aging kidney and the nephrotoxic effects of mercury [Internet]. Vol. 20, *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*. Taylor and Francis Inc.; 2017 [cited 2021 Jun 26]. p. 55–80. Available from: </pmc/articles/PMC6088787/>
42. Schmitt R, Melk A. Molecular mechanisms of renal aging [Internet]. Vol. 92, *Kidney International*. Elsevier B.V.; 2017 [cited 2021 Jun 26]. p. 569–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28729036/>
43. Bitzer M, Wiggins J. Aging Biology in the Kidney [Internet]. Vol. 23, *Advances in Chronic Kidney Disease*. W.B. Saunders; 2016 [cited 2021 Jun 26]. p. 12–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26709058/>
44. Denic A, Glasscock RJ, Rule AD. Structural and Functional Changes With the Aging Kidney [Internet]. Vol. 23, *Advances in Chronic Kidney Disease*. W.B. Saunders; 2016 [cited 2021 Jun 26]. p. 19–28. Available from: </pmc/articles/PMC4693148/>
45. Gekle M. Kidney and aging — A narrative review [Internet]. Vol. 87, *Experimental Gerontology*. Elsevier Inc.; 2017 [cited 2021 Jun 26]. p. 153–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27032877/>
46. Kimura T, Isaka Y, Yoshimori T. Autophagy and kidney inflammation [Internet]. Vol. 13, *Autophagy*. Taylor and Francis Inc.; 2017 [cited 2021 Jun 26]. p. 997–1003. Available from: </pmc/articles/PMC5486362/>
47. Li Z, Wang Z. Aging kidney and aging-related disease. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. Springer New York LLC; 2018 [cited 2021 Jun 26]. p. 169–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30232759/>
48. Liu X, Zhang R, Huang L, Zheng Z, Vlassara H, Striker G, et al. Excessive oxidative stress contributes to increased acute ER stress kidney injury in aged mice. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2019 [cited 2021 Jun 26];2019. Available from: </pmc/articles/PMC6369482/>
49. Dennis JM, Witting PK. Protective role for antioxidants in acute kidney disease

- [Internet]. Vol. 9, *Nutrients*. MDPI AG; 2017 [cited 2021 Jun 26]. Available from: [/pmc/articles/PMC5537833/](#)
50. Hu SJ, Jiang SS, Zhang J, Luo D, Yu B, Yang LY, et al. Effects of apoptosis on liver aging [Internet]. Vol. 7, *World Journal of Clinical Cases*. Baishideng Publishing Group Co; 2019 [cited 2021 Jun 26]. p. 691–704. Available from: [/pmc/articles/PMC6448073/](#)
  51. Stahl EC, Haschak MJ, Popovic B, Brown BN. Macrophages in the aging liver and age-related liver disease [Internet]. Vol. 9, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2018 [cited 2021 Jun 26]. p. 2795. Available from: [/pmc/articles/PMC6284020/](#)
  52. Hunt NJ, Kang SW (Sophie), Lockwood GP, Le Couteur DG, Cogger VC. Hallmarks of Aging in the Liver [Internet]. Vol. 17, *Computational and Structural Biotechnology Journal*. Elsevier B.V.; 2019 [cited 2021 Jun 26]. p. 1151–61. Available from: [/pmc/articles/PMC6709368/](#)
  53. Luceri C, Bigagli E, Femia A Pietro, Caderni G, Giovannelli L, Lodovici M. Aging related changes in circulating reactive oxygen species (ROS) and protein carbonyls are indicative of liver oxidative injury. *Toxicol Reports* [Internet]. 2018 [cited 2021 Jun 26];5:141–5. Available from: [/pmc/articles/PMC5977162/](#)
  54. Gheorghe A, Pérez de Heredia F, Hunsche C, Redondo N, Díaz LE, Hernández O, et al. Oxidative stress and immunosenescence in spleen of obese mice can be reversed by 2-hydroxyoleic acid. *Exp Physiol* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2021 Jun 26];102(5):533–44. Available from: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1113/EP086157>
  55. Quinti I, Paganelli R. Asplenia. In: *Stiehm's Immune Deficiencies* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014 [cited 2021 Jun 26]. p. 835–44. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538171/>
  56. Li L, Duan M, Chen W, Jiang A, Li X, Yang J, et al. The spleen in liver cirrhosis: Revisiting an old enemy with novel targets [Internet]. Vol. 15, *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central Ltd.; 2017 [cited 2021 Jun 26]. p. 111. Available from: [/pmc/articles/PMC5442653/](#)
  57. Rüfer A, Wuillemin WA. Die milz bei nicht-malignen hämatologischen erkrankungen. *Ther Umschau* [Internet]. 2013 Mar [cited 2021 Jun 26];70(3):157–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23454562/>
  58. Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC): an important partner in cellular/tissue senescence [Internet]. Vol. 19, *Biogerontology*. Springer Netherlands; 2018 [cited 2021 Jun 26]. p. 325–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29959657/>
  59. Quarles EK, Dai DF, Tocchi A, Basisty N, Gitari L, Rabinovitch PS. Quality control systems in cardiac aging [Internet]. Vol. 23, *Ageing Research Reviews*. Elsevier Ireland Ltd; 2015 [cited 2021 Jun 26]. p. 101–15. Available from: [/pmc/articles/PMC4686341/](#)
  60. Lakatta EG. So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease? *J Mol Cell*

- Cardiol [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2021 Jun 26];83:1–13. Available from: [/pmc/articles/PMC4532266/](#)
61. Ikeda Y, Sciarretta S, Nagarajan N, Rubattu S, Volpe M, Frati G, et al. New insights into the role of mitochondrial dynamics and autophagy during oxidative stress and aging in the heart [Internet]. Vol. 2014, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Publishing Corporation; 2014 [cited 2021 Jun 26]. Available from: [/pmc/articles/PMC4124219/](#)
  62. Martín-Fernández B, Gredilla R. Mitochondria and oxidative stress in heart aging [Internet]. Vol. 38, *Age*. Springer Netherlands; 2016 [cited 2021 Jun 26]. p. 225–38. Available from: [/pmc/articles/PMC5061683/](#)
  63. Obas V, Vasan RS. The aging heart [Internet]. Vol. 132, *Clinical Science*. Portland Press Ltd; 2018 [cited 2021 Jun 26]. p. 1367–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29986877/>
  64. Tocchi A, Quarles EK, Basisty N, Gitari L, Rabinovitch PS. Mitochondrial dysfunction in cardiac aging. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2021 Jun 26];1847(11):1424–33. Available from: [/pmc/articles/PMC4575872/](#)
  65. Solovyeva EM, Ibebunjo C, Utzinger S, Eash JK, Dunbar A, Naumann U, et al. New insights into molecular changes in skeletal muscle aging and disease: Differential alternative splicing and senescence. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2021 Jun 27];197:111510. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0047637421000828>
  66. Mansour KMK, Goulart C da L, Carvalho-Junior LCS de, Trimer R, Borghi-Silva A, Silva ALG da. Pontos de corte da função pulmonar e capacidade funcional determinantes para sarcopenia e dinapenia em pacientes com DPOC. *J Bras Pneumol*. 2019;45(6):1–7.
  67. Aoi W, Sakuma K. Oxidative Stress and Skeletal Muscle Dysfunction with Aging. *Curr Aging Sci* [Internet]. 2012 Oct 30 [cited 2021 Jun 27];4(2):101–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21235498/>
  68. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases [Internet]. Vol. 13, *Clinical Interventions in Aging*. Dove Medical Press Ltd.; 2018 [cited 2021 Jun 21]. p. 757–72. Available from: [/pmc/articles/PMC5927356/](#)
  69. Tromm CB, Brancher EA, Souza PS, Effting PS, Pedroso GS, Silva LA, et al. The difference in age is not a key-factor in the modulation of acute exercise-induced muscle oxidative stress. *Rev Bras Ciencias do Esporte* [Internet]. 2018;40(3):273–80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rbce.2018.03.016>
  70. Scicchitano BM, Pelosi L, Sica G, Musarò A. The physiopathologic role of oxidative stress in skeletal muscle. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 2018;170(July 2017):37–44. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.08.009>
  71. Liang SY. Sepsis and Other Infectious Disease Emergencies in the Elderly [Internet]. Vol. 34, *Emergency Medicine Clinics of North America*. W.B.

- Saunders; 2016 [cited 2021 May 23]. p. 501–22. Available from: [/pmc/articles/PMC5022369/](#)
72. Caraballo C, Jaimes F. Organ dysfunction in sepsis: An ominous trajectory from infection to death. *Yale J Biol Med* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2021 Jun 27];92(4):629–40. Available from: [/pmc/articles/PMC6913810/](#)
  73. Lambden S, Laterre PF, Levy MM, Francois B. The SOFA score - Development, utility and challenges of accurate assessment in clinical trials [Internet]. Vol. 23, *Critical Care*. BioMed Central Ltd.; 2019 [cited 2021 Jun 6]. Available from: [/pmc/articles/PMC6880479/](#)
  74. Monneret G, Gossez M, Aghaeepour N, Gaudilliere B, Venet F. How Clinical Flow Cytometry Rebooted Sepsis Immunology [Internet]. Vol. 95, *Cytometry Part A*. Wiley-Liss Inc.; 2019 [cited 2021 Jun 27]. p. 431–41. Available from: [/pmc/articles/PMC6461502/](#)
  75. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2021 Jun 27];43(3):304–77. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00134-017-4683-6>
  76. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis [Internet]. Vol. 5, *Virulence*. Taylor and Francis Inc.; 2014 [cited 2021 Jun 27]. p. 4–11. Available from: [/pmc/articles/PMC3916382/](#)
  77. Silva E, Pedro M de A, Sogayar ACB, Mohovic T, Silva CL de O, Janiszewski M, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care* [Internet]. 2004 [cited 2021 Jun 27];8(4):R251. Available from: [/pmc/articles/PMC522852/](#)
  78. Sepse IL-A para E da. *Sepse : Um problema de saúde pública*. 2015.
  79. Machado FR, Cavalcanti AB, Bozza FA, Ferreira EM, Angotti Carrara FS, Sousa JL, et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): An observational study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2021 Jun 27];17(11):1180–9. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S1473309917303225/fulltext>
  80. Sogayar AMC, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grion CMC, Lobo SMA, et al. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. *Pharmacoeconomics* [Internet]. 2008 [cited 2021 Jun 27];26(5):425–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18429658/>
  81. Shenoy S. Coronavirus (Covid-19) sepsis: revisiting mitochondrial dysfunction in pathogenesis, aging, inflammation, and mortality [Internet]. Vol. 69, *Inflammation Research*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2020 [cited 2021 May 23]. p. 1077–85. Available from: [/pmc/articles/PMC7410962/](#)

82. Morin EE, Guo L, Schwendeman A, Li XA. HDL in sepsis - risk factor and therapeutic approach. *Front Pharmacol* [Internet]. 2015 [cited 2021 Jun 27];6(OCT):23. Available from: [/pmc/articles/PMC4616240/](#)
83. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) [Internet]. Vol. 315, *JAMA - Journal of the American Medical Association*. American Medical Association; 2016 [cited 2021 Jun 6]. p. 801–10. Available from: [/pmc/articles/PMC4968574/](#)
84. Prauchner CA. Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy [Internet]. Vol. 43, *Burns*. Elsevier Ltd; 2017 [cited 2021 Jun 27]. p. 471–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28034666/>
85. Mantzaris K, Tsolaki V, Zakynthinos E. Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies [Internet]. Vol. 2017, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2017 [cited 2021 Jun 27]. Available from: [/pmc/articles/PMC5585571/](#)
86. Kumar S, Gupta E, Kaushik S, Kumar Srivastava V, Mehta SK, Jyoti A. Evaluation of oxidative stress and antioxidant status: Correlation with the severity of sepsis. *Scand J Immunol*. 2018 Apr 1;87(4).
87. Margotti W, Giustina A Della, de Souza Goldim MP, Hubner M, Cidreira T, Denicol TL, et al. Aging influences in the blood-brain barrier permeability and cerebral oxidative stress in sepsis. *Exp Gerontol* [Internet]. 2020 Oct 15 [cited 2021 May 22];140. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32827711/>
88. Taeb AM, Hooper MH, Marik PE. Sepsis: Current definition, pathophysiology, diagnosis, and management [Internet]. Vol. 32, *Nutrition in Clinical Practice*. SAGE Publications Inc.; 2017 [cited 2021 Jun 6]. p. 296–308. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28537517/>
89. Chakraborty RK, Burns B. Systemic Inflammatory Response Syndrome [Internet]. *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2021 [cited 2021 Jun 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31613449>
90. Hotchkiss RS, Karl IE. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis [Internet]. 2003. Available from: [www.nejm.org](http://www.nejm.org)
91. Lewis AJ, Billiar TR, Rosengart MR. Biology and Metabolism of Sepsis: Innate Immunity, Bioenergetics, and Autophagy. *Surg Infect (Larchmt)* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2021 Jun 6];17(3):286–93. Available from: [/pmc/articles/PMC4876546/](#)
92. Minasyan H. Sepsis and septic shock: Pathogenesis and treatment perspectives. Vol. 40, *Journal of Critical Care*. W.B. Saunders; 2017. p. 229–42.
93. Lelubre C, Vincent JL. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2018;14(7):417–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41581-018-0005-7>

94. Xia W, Pan Z, Zhang H, Zhou Q, Liu Y. Inhibition of ERR  $\alpha$  Aggravates Sepsis-Induced Acute Lung Injury in Rats via Provoking Inflammation and Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2020 [cited 2021 May 23];2020. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32714486/>
95. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C, Wald R, Martensson J, Maiden M, et al. Acute kidney injury in sepsis [Internet]. Vol. 43, *Intensive Care Medicine*. Springer Verlag; 2017 [cited 2021 Jun 27]. p. 816–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28364303/>
96. Yao Y, Wang D, Yin Y. Advances in sepsis-associated liver dysfunction. *Burn Trauma* [Internet]. 2014 [cited 2021 Jun 27];2(3):97. Available from: </pmc/articles/PMC5012093/>
97. Alblihed MA. Hydroxytyrosol ameliorates oxidative challenge and inflammatory response associated with lipopolysaccharide-mediated sepsis in mice. *Hum Exp Toxicol* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2021 May 23];40(2):342–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32840384/>
98. Maestraggi Q, Lebas B, Clere-Jehl R, Ludes PO, Chamaroux-Tran TN, Schneider F, et al. Skeletal Muscle and Lymphocyte Mitochondrial Dysfunctions in Septic Shock Trigger ICU-Acquired Weakness and Sepsis-Induced Immunoparalysis [Internet]. Vol. 2017, *BioMed Research International*. Hindawi Limited; 2017 [cited 2021 Jun 27]. Available from: </pmc/articles/PMC5447268/>
99. Thoma A, Lightfoot AP. Nf-kb and inflammatory cytokine signalling: Role in skeletal muscle atrophy. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. Springer New York LLC; 2018 [cited 2021 Jun 7]. p. 267–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30390256/>
100. Lakshmikanth CL, Jacob SP, Chaithra VH, de Castro-Faria-Neto HC, Marathe GK. Sepsis: in search of cure [Internet]. Vol. 65, *Inflammation Research*. Birkhauser Verlag AG; 2016 [cited 2021 Jun 27]. p. 587–602. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26995266/>
101. deSa LA. Factors influencing wound infection (a prospective study of 280 cases). *J Postgrad Med* [Internet]. 1984 [cited 2021 Jun 27];30(4):232. Available from: <https://www.jpgmonline.com/article.asp?issn=0022-3859;year=1984;volume=30;issue=4;spage=232;epage=6;aulast=desa>
102. Du Pont-Thibodeau G, Joyal JS, Lacroix J. Management of neonatal sepsis in term newborns. *F1000Prime Rep* [Internet]. 2014 [cited 2021 Jun 27];6. Available from: </pmc/articles/PMC4126544/>
103. Toscano MG, Ganea D, Gamero M. Cecal ligation puncture procedure. *J Vis Exp* [Internet]. 2011 [cited 2021 Jun 27];(51):2860. Available from: </pmc/articles/PMC3339843/>
104. Nemzek JA, Hugunin KMS, Opp MR. Modeling sepsis in the laboratory: Merging sound science with animal well-being [Internet]. Vol. 58, *Comparative Medicine*. American Association for Laboratory Animal Science; 2008 [cited 2021 Jun 27]. p. 120–8. Available from: </pmc/articles/PMC2703167/>

105. Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: The gold standard model for polymicrobial sepsis? [Internet]. Vol. 19, Trends in Microbiology. Trends Microbiol; 2011 [cited 2021 Jun 27]. p. 198–208. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21296575/>
106. Siempos II, Lam HC, Ding Y, Choi ME, Choi AMK, Ryter SW. Cecal ligation and puncture-induced sepsis as a model to study autophagy in mice. J Vis Exp [Internet]. 2014 Feb 9 [cited 2021 Jun 27];84(84):51066. Available from: </pmc/articles/PMC4122027/>
107. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Model organisms: Animal models of sepsis: Setting the stage [Internet]. Vol. 4, Nature Reviews Drug Discovery. Nat Rev Drug Discov; 2005 [cited 2021 Jun 27]. p. 854–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16224456/>
108. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. J Surg Res [Internet]. 1990 [cited 2021 Jun 27];49(2):186–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2199735/>
109. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. Nat Protoc [Internet]. 2009 [cited 2021 Jun 27];4(1):31–6. Available from: </pmc/articles/PMC2754226/>
110. Amanzada A, Malik IA, Nischwitz M, Sultan S, Naz N, Ramadori G. Myeloperoxidase and elastase are only expressed by neutrophils in normal and in inflamed liver. Histochem Cell Biol [Internet]. 2011 Mar [cited 2021 Jun 27];135(3):305–15. Available from: </pmc/articles/PMC3052504/>
111. De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. Agents Actions [Internet]. 1989 Mar [cited 2021 Jun 27];26(3–4):335–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2567568/>
112. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. Methods Enzymol [Internet]. 1990 Jan 1 [cited 2021 Jun 27];186(C):421–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2233309/>
113. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. Methods Enzymol [Internet]. 1990 Jan 1 [cited 2021 Jun 27];186(C):464–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1978225/>
114. Bannister J V., Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. [Internet]. Vol. 32, Methods of biochemical analysis. Methods Biochem Anal; 1987 [cited 2021 Jun 27]. p. 279–312. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3033431/>
115. Aebi H. Catalase in Vitro. Methods Enzymol [Internet]. 1984 Jan 1 [cited 2021 Jun 27];105(C):121–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6727660/>
116. Olson BJSC. Assays for determination of protein concentration. Curr Protoc Pharmacol [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2021 Jun 27];2016:A.3A.1-A.3A.32.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27248579/>

117. Okeke EB, Uzonna JE. In Search of a Cure for Sepsis: Taming the Monster in Critical Care Medicine. *J Innate Immun* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2021 Jul 6];8(2):156. Available from: </pmc/articles/PMC6738754/>

## ANEXOS

## ANEXO A- Parecer Aprovação do Comitê de Ética



Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação  
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 01 de julho de 2020  
Registro na CEUA Nº 20.020.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Fabricia Cardoso Petronilho

Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Estudo do efeito do envelhecimento sobre o estresse oxidativo em órgãos periféricos após a sepse experimental em ratos", registrada com o nº 20.020.4.01.IV, sob a responsabilidade de Fabricia Cardoso Petronilho - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 13 de julho de 2020.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,

---

Prof. Sandro Melim Sgrott  
Coordenador da Comissão