

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: MEDICINA

***Parâmetros Oxidativos Plasmáticos na
Determinação do Desfecho e Resposta ao
Tratamento com Antioxidantes na Sepse***

Tese apresentada para obtenção de grau de Doutor
pelo Médico MÁRCIO OSORIO GUERREIRO, sob
orientação do Prof. Dr. FELIPE DAL-PIZZOL

Porto Alegre – Rio Grande do Sul - Brasil

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: MEDICINA

***Parâmetros Oxidativos Plasmáticos na
Determinação do Desfecho e Resposta ao
Tratamento com Antioxidantes na Sepsé***

Tese apresentada para obtenção de grau de Doutor
pelo Médico MÁRCIO OSORIO GUERREIRO, sob
orientação do Prof. Dr. FELIPE DAL-PIZZOL

Porto Alegre – Rio Grande do Sul - Brasil

2006

Agradecimentos

Ao professor Felipe Dal-Pizzol, pois além da abnegada orientação, um grande amigo, a quem deixo meu eterno reconhecimento de gratidão.

A colega Cristiane Ritter por ter me apresentado seu Professor orientador e me estimulado a realizar esta formação.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pelotas, em especial ao amigo Michael Andrades, pela sua paciência em demonstrar os conhecimentos de técnicas laboratoriais.

Ao Professor Fernando Dias, mestre que me ensinou os caminhos da Medicina Intensiva e me estimulou a trilhar novos caminhos como pesquisador.

Aos meus pais José Luiz Vieira Guerreiro e Maria Helena Osório Guerreiro por terem permitido minha existência e guiado minha formação

A minha esposa Caroline por sua compreensão e estímulo para seguir em frente.

Dedicatória

À minha família:

Caroline

Marcos

Por sua resignação, compreensão, apoio e incentivo, os quais muitas vezes privei de minha companhia.

Cada atitude, cada gesto, cada decisão são como as sementes de uma romã ou os tijolos de um edifício, insignificantes por si só, mas fundamentais para compor o todo.

Abreviaturas

AP-1 – Fator de transcrição AP-1

ATP – Adenosina trifosfato

bpm – Batimentos por minuto

CAT – Atividade da catalase

CLP – Ligação e perfuração cecal

EAO – Espécies ativas de oxigênio

EC-SOD – Superóxido dismutase extracelular

HMG-I - Proteínas do grupo de alta mobilidade I

ICAM-1 – Molécula de adesão intracelular I

IL – Interleucinas

LBP – Proteína ligadora de lipopolissacarídeo

LPA – Lesão Pulmonar Aguda

LPS – Lipopolissacarídeo

MD2 – Molécula de superfície MD2

mmHg – Milímetros de Mercúrio

mpm – Movimentos por minuto

NAD – Dinucleotídeo adenina nicotinamida

NF- κ B – Fator nuclear Kappa B

NO – Óxido nítrico

PaCO₂ – Pressão arterial de dióxido de carbono

PARS – poli(ADP)-sintase

SDRA – Síndrome da Disfunção Respiratória Aguda

SIRS – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

SOD - Atividade de superóxido dismutase

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TLR – Receptor Toll-like

TNF – Fator de necrose tumoral

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

Lista de Figuras

FIGURA 1	Definições de SIRS e Sepse, baseado na Conferência de Consenso de Sepse	09
FIGURA 2	Geração de radical hidroxil.....	12

Sumário

Resumo	10
Abstract	11
Introdução	12
Referencial Teórico	17
Modelos animais de sepse	18
Pacientes criticamente doentes	19
Pacientes com choque séptico	20
Uso de Antioxidantes	21
N-acetilcisteína	21
Objetivo	26
Objetivos específicos	26
Referências bibliográficas	27
Artigo em Inglês	37
Abstract	37
Material and Methods	39
Animal models of sepsis	39
Experimental protocols	39
Survival experiments	40
Measurements	41
Reagents	42
Statistical Analysis	43
Results	43
Discussion	45
Figures	49

References	65
Artigo em Português	69
Resumo	69
Material e métodos	71
Modelo animal de sepse	71
Protocolo experimental	71
Experimento de sobrevivência	72
Medidas	74
Reagentes	75
Análise Estatística	75
Resultados	76
Discussão	78
Gráficos	82
Referências	98
Considerações Finais	102

segunda amostra de animais mediu-se sangue de veia central e cominciou-se o não tratamento após 12h da indução de sepse.

RESULTADOS: níveis elevados de proteínas carbonílicas e de SOD no diagnóstico de sepse são relacionados com óbito por sepse nesta amostra. Estes parâmetros são correlacionados com a gravidade da doença avaliada pelos scores APACHE II e MODS. Níveis de atividade da SOD podem prever resposta ao tratamento com antioxidantes no modelo CLP, tanto 3 como 12h após a indução de sepse.

CONCLUSÃO: Parâmetros oxidativos são associados com gravidade e desfecho de sepse em UTI geral, e podem prever resposta ao tratamento antioxidante em animais.

Palavras Chave: Estresse Oxidativo, Sepse, Superóxido-dismutase, N-acetilcisteína, Deferoxamina

Resumo

OBJETIVOS: determinar a relação entre parâmetros de estresse oxidativo, gravidade de sepse e resposta ao tratamento com antioxidantes.

MATERIAL E MÉTODOS: foram incluídos pacientes consecutivos admitidos na UTI de um hospital terciário com o diagnóstico de sepse, sepse grave ou choque séptico. Os pacientes foram avaliados diariamente e foi coletado sangue imediatamente após a inclusão no estudo (máximo de 12h após diagnóstico de sepse). Avaliou-se os níveis séricos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), carbonilação de proteínas, atividade de superóxido dismutase (SOD) e catalase. Estas variáveis foram correlacionadas com desfecho e variáveis clínicas. Para determinar a relação dos parâmetros oxidativos na resposta ao tratamento, utilizamos o modelo de ligação cecal e perfuração (CLP) empregando ou não tratamento antioxidante (N-acetilcisteína mais deferoxamina). Coletou-se sangue da veia caudal 3h após a indução de sepse e correlacionou-se os parâmetros com resposta ao tratamento antibiótico e antioxidante. Para determinar se o tratamento antioxidante poderia ser retardado por 12h, em uma segunda amostra de animais coletou-se sangue da veia caudal e administrou-se ou não tratamento após 12h da indução de sepse.

RESULTADOS: níveis elevados de proteínas carboniladas e de SOD no diagnóstico de sepse são relacionados com óbito por sepse nesta amostra. Estes parâmetros são correlacionados com a gravidade da doença avaliada pelos escores APACHE II e MODS. Níveis de atividade da SOD podem prever resposta ao tratamento com antioxidantes no modelo CLP, tanto 3 como 12h após a indução de sepse.

CONCLUSÃO: Parâmetros oxidativos são associados com gravidade e desfecho de sepse em UTI geral, e podem prever resposta ao tratamento antioxidante em animais.

Palavras Chave: Estresse Oxidativo, Sepse, Superoxidodismutase, N-acetilcisteína, Deferoxamina

Abstract

OBJECTIVE: determine the relationship between oxidative stress parameters, sepsis severity and treatment response to antioxidants.

MATERIALS AND METHODS: were included consecutive patients admitted on ICU at a tertiary care Hospital with sepsis, severe sepsis or septic shock. The patients were evaluated, blood samples were collected immediately after study inclusion (12h maximum after sepsis diagnosis). We determined plasma levels of thiobarbituric acid reactive species (TBARS), protein carbonyls, superoxide dismutase (SOD) and catalase activities and correlate it to clinical parameters. To determine the relation between oxidative parameters and response to antioxidant treatment we used the cecal ligation and perforation (CLP) model of sepsis, using or not antioxidants (n-acetylcysteine plus deferoxamine) 3 or 12 hours after CLP.

RESULTS: non-survivor septic patients presented higher protein carbonyls and SOD activity when compared to survivor patients. These parameters were correlated to APACHE II and MODS in our sample. In addition, plasma SOD levels predicted response to antioxidant treatment in the CLP model, both 3 and 12 hours after sepsis induction.

CONCLUSION: Oxidative parameters are correlated to severity and outcome in septic patients and could predict response to antioxidant treatment in the CLP model.

Key words: Oxidative stress, sepsis, superoxidedismutase, n-acetylcysteine, deferoxamine.

Introdução

A incidência da sepse tem aumentado desde os anos 30^{1,2}, e todas as recentes evidências sugerem que este aumento persiste nos últimos anos. As razões para este fato são várias: aumento do uso de procedimentos invasivos, uso amplo de imunossupressores e de agentes citotóxicos, maior sobrevivência de pacientes crônicos (p. ex. diabetes) e maior número de infecções por organismos multirresistentes².

Apesar dos consideráveis avanços, a sepse continua sendo a principal causa de mortalidade em UTI³. A sua incidência aumentou de 82,7 casos por 100.000 habitantes em 1979 para 240,4 por 100.000 em 2000². A mortalidade hospitalar varia de 28 a 60% de acordo com a gravidade - sepse, sepse grave ou choque séptico^{4,5,6,7,8} (**figura 1**). No Brasil, a incidência de sepse é de aproximadamente 200000 casos por ano, com uma mortalidade entre 35 e 45% para sepse grave, e entre 52 e 65% para choque séptico^{9,10}.

SIRS	Dois ou mais dos seguintes critérios: <ul style="list-style-type: none">• Temperatura >38⁰C ou <36⁰C• Frequência cardíaca > 90 bpm• Frequência respiratória > 20mpm ou PaCO₂<32mmHg• Leucócitos >12000cel/mm³, <4000cél/mm³ ou >10% formas jovens
Sepse	SIRS associada a um foco infeccioso documentado
Sepse Grave	Sepse associada com hipoperfusão tecidual ou hipotensão. Hipoperfusão: oligúria, alteração do estado mental, hiperlactatemia Hipotensão: pressão sistólica < 90mmHg ou uma redução nos valores basais de 40mmHg na ausência de outras causas
Choque Séptico	Sepse induzindo hipotensão a despeito de adequada reposição volêmica, ou necessidade de agentes vasopressores

Figura 1: Definições de SIRS e Sepse, baseado na Conferência de Consenso de Sepse¹¹

Apesar da importância da sepse na mortalidade global em UTI, grande parte do tratamento empregado é meramente de suporte. Um melhor entendimento da sua fisiopatologia através de trabalhos experimentais pode fornecer dados preliminares e novos protocolos experimentais de tratamento, para serem posteriormente validados em ensaios clínicos e empregados na prática médica^{12,13,14}.

Após interação da bactéria (ou outro microrganismo) com a célula do hospedeiro, inicia-se uma série de eventos com o objetivo de deter o processo infeccioso. Componentes da parede celular das bactérias, como por exemplo, os lipopolissacarídeos (LPS), em bactérias gram negativas, interagem com a sua proteína ligadora LBP (proteína ligadora do LPS) nas células do hospedeiro e o aderem ao CD14, uma proteína ancorada no lado de fora da membrana plasmática, a qual por estar no espaço extracelular, pode induzir ativação celular sem um co-receptor para traduzir o sinal através da membrana^{15,16,17,18}. Inúmeras investigações levaram a identificação dos receptores Toll Like 4 (TLR4) como co-receptor para LPS, são proteínas transmembrana com componentes extracelular e intracelular¹⁷.

TLRs tem um domínio intracelular homólogo com o receptor de IL-1 e IL-18. Proteínas adaptadoras facilitam a ligação com a quinase associada ao receptor da IL-1, o que induz o fator 6 associado ao receptor de TNF α , levando a translocação nuclear de NF κ B e ultimamente a ativação de genes promotores de citocinas^{16,17}. Embora este modelo seja baseado no LPS ativando TLR4, um processo similar, mas não idêntico é envolvido na ativação de TLR2 por bactérias gram positivo.

Não existem endotoxinas em bactérias gram positivo, mas sua parede celular contém peptidoglicano e ácido lipoteicóico. Tanto o peptidoglicano como o ácido lipoteicóico, podem se ligar a receptores de superfície celular e são pro-inflamatórios, embora sejam muito menos ativos do que o LPS^{16,17}. Apesar do CD14 ter sido originalmente identificado como co-receptor que media a ativação de LPS de monócitos,

subseqüentes trabalhos tem demonstrado que ele participa na ativação por componentes da parede celular de bactérias gram positivas tais como peptidoglicanos^{19,20}.

Uma família de 10 TLRs foi identificada com uma grande variedade de ligações específicas, incluindo bactérias, fungos e leveduras. Então TLR4 é o receptor de LPS, TLR2 é predominantemente responsável pelo reconhecimento de estruturas da parede celular de gram positivos. TLR5 é o receptor para fragelina e TLR9 reconhece elementos no DNA bacteriano^{16,17}. Uma molécula adicional da superfície celular MD2 tem sido identificada como necessária para a ativação de TLR4²¹. Ratos com MD2 nocauteadas não respondem a LPS e sobrevivem ao choque endotóxico. O papel do MD2 parece ser de posicionar corretamente TLR4 na superfície celular¹⁷.

Seguindo este processo de interação entre bactéria e células do hospedeiro há uma coordenada e sistêmica reação inflamatória. Os monócitos liberam muitos mediadores inflamatórios, especialmente IL-1, IL-6 e TNF α , mas além disso, uma variedade de outras citocinas, incluindo IL-12, IL-15 e IL-18¹⁶. Estes mediadores por sua vez, ativam um segundo nível de moléculas, incluindo outras citocinas, mediadores lipídicos, *espécies reativas de oxigênio*, assim como super-regulação de moléculas de adesão que promovem a migração de células inflamatórias (polimorfonucleares) para diversos tecidos¹⁶.

Todos estes mediadores podem induzir alterações profundas na fisiologia normal da vasculatura e órgãos-alvo. Apesar de alguns mediadores serem mais importantes que outros, provavelmente sua ação conjunta é responsável pela patogênese da sepse.

Dentre os mediadores envolvidos na gênese da sepse destacam-se²²:

- Citocinas: IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, TNF α , HMGB1. Derivadas do sistema monócito/macrófago e do endotélio. Ativam neutrófilos, linfócitos e o próprio endotélio vascular. Induzem prostaglandinas, óxido nítrico sintase e proteínas de fase aguda¹⁶.

- Óxido nítrico (NO): modulação da expressão de óxido nítrico sintetase leva a um aumento na produção de NO, que pode estar associado parcialmente à hipotensão relacionada a sepse²³;
- Mediadores lipídicos: Fator ativador de plaquetas (PAF), prostaglandinas, leucotrienos, tromboxane e fator tecidual. Ativam o endotélio vascular, regulam o tônus vascular e ativam a cascata da coagulação¹⁶
- Espécies ativas de oxigênio (EAO): recentemente tem-se identificado as EAO como mediadores de diversas fases de dano celular e ativação de células imunes durante a sepse²⁴

A interação dos diversos mediadores leva a depressão miocárdica, alteração da função vascular e dano em órgãos-alvo (principalmente fígado, rim, pulmão e sistema nervoso central) e em alguns casos a morte por hipotensão refratária ou falência de múltiplos órgãos.

Dentre os mediadores envolvidos na resposta sistêmica da sepse tem-se dado atenção especial para as EAO. Produzidas no compartimento vascular e nos órgãos-alvo podem ser efetoras de diversas alterações patológicas envolvidas na doença. A produção de EAO pode contribuir para o dano em órgãos-alvo e para a regulação da produção de citocinas, tendo assim papel relevante na gênese da sepse²⁴.

Antioxidantes são o centro do equilíbrio das reações redox no corpo humano. Eles não agem isoladamente, mas sinergicamente. Primariamente, previnem a formação de radicais de oxigênio, através da remoção de seus precursores, e em nível secundário, reagem com EAO que já tenham sido previamente formadas, seja para remove-las ou inibi-las. Em um indivíduo sadio, existe um equilíbrio entre a produção de EAO e sua detoxificação na célula normal²⁵. Quando existe um aumento na produção, ou uma

alteração nas defesas antioxidantes existe uma condição chamada de estresse oxidativo²⁶.

Deste modo, o objetivo deste estudo foi determinar, em um modelo animal de sepse, se parâmetros plasmáticos, oxidativos ou inflamatórios, poderiam prever resposta a tratamento antioxidante, e se estes parâmetros poderiam prever mortalidade por sepse em humanos.

Referencial Teórico

A produção de EAO inicia usualmente pela formação de anions superóxido (O_2^-), a superóxido dismutase (SOD) converte o O_2^- em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e este através de reações mediadas pelo ferro (reação de Fenton) se converte em radical hidroxil (OH^\cdot) (**Figura 2**)²⁶. Dentre todas as formas de geração de estresse oxidativo, a produção de peróxido de hidrogênio parece ter um papel central tanto na produção celular, através do metabolismo oxidativo, quanto na ação citotóxica de diversos agentes exógenos. Entretanto, por ser o peróxido de hidrogênio um oxidante relativamente estável, acredita-se que seus efeitos biológicos sejam mediados pelo radical hidroxil²⁶. A grande produção de superóxido facilita também sua reação com o óxido nítrico e conseqüente geração de peroxinitrito, que em conjunto com o radical hidroxil são as EAO mais danosas²⁷. Dentre os efeitos deletérios deles ressalta-se a ativação da enzima poli(ADP)-sintase (PARS). O dano ao DNA, secundário à geração de peroxinitrito ou radical hidroxil, ativa a PARS que leva a depleção de NAD celular e conseqüente depleção de ATP, sendo uma via importante de dano e morte celular²⁷.

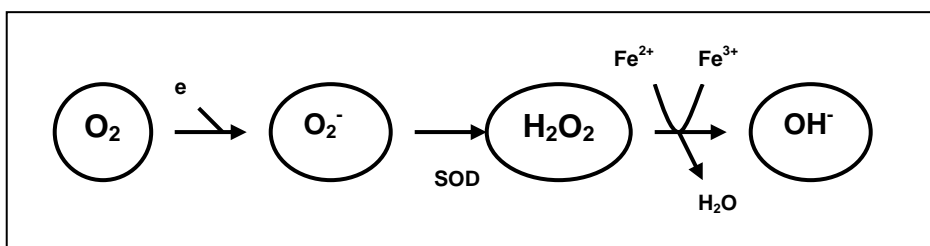


Figura 2: Geração de radical hidroxil²⁶

As EAO também atuam no controle de diversas vias de sinalização celular. Os primeiros componentes de sinalização celular identificados como responsivos às EAO, foram fatores de transcrição²⁸. Dentre eles, o fator nuclear- κ B (NF- κ B) e o AP-1 são de grande importância para a expressão de mediadores. A sinalização redox pode auxiliar a orquestrar a resposta inflamatória pela indução da síntese de citocinas que afetam a função de macrófagos e induzem a migração de neutrófilos durante o choque²⁶.

Antioxidantes são o centro do balanço das reações Redox no corpo humano. Defesas antioxidantes endógenas existem em várias localizações intra-celular, na membrana celular e extra-celular²⁵. Incluem enzimas tais como superóxido dismutase (SOD), catalase, e glutathione peroxidase (GSHPx), assim como, vitamina E, vitamina C, h-caroteno, ácido úrico e bilirrubinas, além de outras proteínas (ceruloplasmina, transferrina, haptoglobina e albumina)^{26,27}.

As enzimas SOD são uma família de metalo enzimas que rapidamente promovem a conversão de superóxido a peróxido de hidrogênio²⁶. Três formas de SOD são reconhecidamente importantes: Cobre-zinco SOD, um homodímero de 32kDa, que está presente no citoplasma e no núcleo das células, Manganês SOD, é um homotetrâmero localizado primariamente na matrix mitocondrial e SOD extracelular (EC-SOD) que é a SOD predominante nos líquidos do extracelular, tais como, linfa, líquido sinovial e plasma, é uma glicoproteína com peso molecular aparente de cerca de 135kDa, está presente em vários organismos como um tetrâmero, ou menos comumente como um dímero^{26,29}.

Na sepse existem muitas fontes em potencial de EAO, incluindo a cadeia de transporte de elétrons, a ativação da xantina-oxidase como resultado de isquemia-reperfusão e, a ativação de neutrófilos²⁷. Neutrófilos ativados produzem superóxido como agente citotóxico, também podem produzir óxido nítrico, o qual pode reagir com superóxido e produzir peroxinitrito²⁶. Sobre condições isquêmicas, seguidas por subsequente perfusão, a enzima xantina-oxidase catalisa a formação de ácido úrico com a co-produção de superóxido. A liberação de superóxido resulta no recrutamento e na ativação de neutrófilos e sua adesão a células endoteliais, as quais estimulam a formação de xantina-oxidase no endotélio²⁸.

Modelos animais de sepse:

Alguns autores demonstraram em diferentes modelos animais de sepse, que a produção de EAO pode estar associada com disfunção contrátil de proteínas musculares,

provavelmente por alteração mitocondrial^{30,31}. Macartur e colaboradores demonstraram que a produção de EAO também estava associada ao choque na sepse, provavelmente por inativação de catecolaminas³².

Basu e Eriksson³³ demonstraram um aumento em marcadores de estresse oxidativo plasmático em modelo de sepse induzida por endotoxina; este aumento era proporcional ao índice de mortalidade observada após a administração da endotoxina. Chang et al^{34,35} demonstraram que estes efeitos podem ser parcialmente devido à ativação de NF- κ B e aumento de expressão de ICAM-1.

Estudos em ratos realizados pelo grupo de Dal-Pizzol^{36,37} reforçam o papel das EAO na sepse, mais especificamente dos íons ferro e do peróxido de hidrogênio gerando radicais hidroxil via reação de Fenton. Demonstrou-se em um modelo animal de sepse que existe um desequilíbrio entre a atividade da SOD e da CAT, e isto parece estar envolvido no acúmulo de peróxido de hidrogênio durante a sepse e mortalidade dos animais³⁶. Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que em modelo de sepse letal comparado com não-letal, o desequilíbrio entre SOD e CAT ocorre mais consistentemente no modelo de sepse letal e isto pode induzir estresse oxidativo e aumentar os níveis de proteínas carbonil quando comparado com modelos de sepse não letal³⁷.

Pacientes criticamente doentes:

O aumento em parâmetros de estresse oxidativo também foi descrito em pacientes criticamente doentes. Takeda e colaboradores encontraram, neste tipo de pacientes, em 1984, níveis reduzidos de α -tocoferol no plasma, acompanhado por aumento dos níveis plasmáticos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), quando comparados com controles, sugerindo aumento na peroxidação lipídica³⁸. Isto foi corroborado por Motoyama que demonstrou que pacientes criticamente doentes apresentam níveis elevados de TBARS, especialmente aqueles de desenvolvem disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (DMOS)³⁹

De Vega et al descreveram níveis elevados de malonaldeído e 4-hidroxinonal e também demonstraram que a severidade de doença pelo escore APACHE III, foi proporcionalmente relacionada com o grau de estresse oxidativo⁴⁰. Winterbourn e colegas demonstraram que concentrações de proteínas carbonil foram elevadas precocemente em sepse grave e em pacientes politraumatizados tanto no plasma como no lavado broncoalveolar⁴¹.

Nosso grupo demonstrou que, níveis plasmáticos de TBARS, proteínas carboniladas e atividade da xantina-oxidase, estavam elevadas em pacientes grande queimados e foram associadas com desfechos desfavoráveis⁴². Outro estudo posterior confirmou a associação de marcadores de estresse oxidativo elevados em pacientes criticamente doentes com maior mortalidade e podendo ser um indicador prognóstico⁴³.

Uma série de outros estudos demonstraram relação entre a deficiência de antioxidantes (ex: vitamina C, vitamina A, vitamina E, licopeno e β -caroteno) com gravidade, DMOS em pacientes criticamente doentes^{44,45,46}.

Pacientes com sepse e choque séptico:

O aumento do estresse oxidativo também foi descrito em pacientes com sepse e choque séptico^{47,48,49,50,51}. Fundamentalmente relacionado à elevação das concentrações plasmáticas de proteínas carboniladas e de peroxidação lipídica.

Goode e colegas investigaram status antioxidantes em pacientes com choque séptico. Eles relataram redução na concentração plasmática de retinol (vitamina A), tocoferol (vitamina E), β -caroteno e Licopeno nestes pacientes comparados com controles saudáveis⁴⁸. Também encontraram aumento nos TBARS plasmáticos em pacientes que desenvolveram três ou mais disfunções orgânicas, sugerindo aumento da peroxidação lipídica⁴⁸. Olgilvie et al confirmaram o aumento da peroxidação lipídica e redução dos níveis de α -tocoferol e selênio em pacientes com choque séptico⁵².

Galley e colegas relataram aumento das concentrações de ferro reativo redox em pacientes com sepse ou choque séptico, conjugados com níveis plasmáticos reduzidos de vitamina C e elevada peroxidação lipídica^{51,53}. O mesmo autor demonstrou um aumento da atividade da Xantina-oxidase e de marcadores de peroxidação lipídica em pacientes adultos com sepse, comparados com voluntários saudáveis, e pacientes não infectados. Esta ativação da xantina-oxidase na sepse confirma a falha no controle da microvasculatura, levando a elevada perfusão e isquemia⁵⁴.

Estes estudos apontam um desequilíbrio no processo patológico envolvendo ativação neutrofílica tanto na sepse como na DMOS. O estresse oxidativo é mais evidente em pacientes com sepse que desenvolvem DMOS e morrem. Se uma relação causal entre a redução da capacidade antioxidante e desfecho for claramente comprovada, suplementação com antioxidantes pode ser fortemente recomendada.

Uso de Antioxidantes:

Existem algumas tentativas de utilizar antioxidantes como adjuvante no tratamento da sepse ou outras desordens inflamatórias sistêmicas^{55,56}. Volcano et al⁵⁷ demonstraram que o uso de quelantes de ferro pode diminuir a mortalidade induzida em modelo de sepse por endotoxina. Hamburger e McCay⁵⁸ demonstraram que o uso de nitronas reduz a mortalidade induzida por endotoxina em ratos. Em modelos animais de choque séptico o uso de miméticos de SOD reduz a resposta inflamatória (por reduzir a ativação de NF- κ B e a expressão das citocinas e moléculas de adesão associadas), diminuem a ativação da PARS, e o dano celular^{59,60}. Além disto, reduzem a hiperreatividade vascular por reduzir a inativação das catecolaminas pelo superóxido, reduzindo a mortalidade em modelos animais relevantes de choque séptico.

N-acetilcisteína:

Outro antioxidante relevante para o estudo da sepse é a N-acetilcisteína, aminoácido com peso molecular de 163.2, com efeitos antiinflamatórios, antioxidantes e

microcirculatórios⁶¹. É a droga de escolha para o tratamento da insuficiência hepática induzida pelo paracetamol, tem inúmeras propriedades farmacológicas com potencial terapêutico em pacientes criticamente doentes⁶². Age como um antioxidante diretamente, através de seus radicais thiol, e indiretamente, pela reposição de estoques celulares diminuídos de glutatona⁶³. Seu potencial anti-inflamatório ocorre pela inibição da ativação, agregação e quimiotaxia de neutrófilos, supressão da ativação de macrófagos, inibição da adesão celular leucócito-endotelial e atenuação da liberação de TNF e IL-8, provavelmente por modular a expressão gene destes mediadores no nível transcripcional⁶³. Estudos em animais sugerem que o pós-tratamento com NAC suprime a liberação de TNF α , IL-6 e IL-10 no choque endotóxico^{64,65}. Estes efeitos benéficos protegem os rins, coração e o fígado do dano induzido por LPS em ratos conscientes.

Alguns autores sugerem que o uso de NAC em pacientes criticamente doentes melhora parâmetros clínicos^{66,67}. Entretanto, outros estudos não conseguiram comprovar melhora dos parâmetros de estresse oxidativo com o uso de NAC em pacientes criticamente doentes.

O papel da NAC no tratamento da LPA/SDRA foi estudado em inúmeros ensaios clínicos^{68,69,70,71}. A administração de NAC tem demonstrado efeitos protetores, repondo os estoques de GSH dentro dos granulócitos pulmonares e no lavado broncoalveolar respectivamente^{68,69}. Entretanto dois diferentes estudos falharam em demonstrar diferenças significativas em endpoints clínicos tais como mortalidade, tempo de permanência em ventilação mecânica, melhora da relação PaO₂/FiO₂ em pacientes com estabelecida SDRA^{70,71}.

Bernard et al em um ensaio clínico de NAC ou procisteína versus placebo, relataram um aumento nos níveis de GSH nas células sanguíneas, uma recuperação mais rápida da LPA, índice cardíaco mais elevado e menor desenvolvimento de DMOS (73% no placebo versus 39% no grupo tratamento p=0,057), mas sem nenhuma mudança na

mortalidade⁷². Ao contrário, Sutter et al demonstraram em um estudo de 61 pacientes, uma melhora na oxigenação arterial e redução do tempo de ventilação mecânica, mas só em pacientes com leve a moderada LPA e sem nenhuma vantagem no desenvolvimento de SDRA⁷³. Então, atualmente, os benefícios clínicos de NAC em pacientes com SDRA em um objetivo forte como mortalidade não foram claramente demonstrados.

Um ensaio clínico de infusão de NAC em uma população mista de pacientes em UTI não demonstrou melhora no potencial antioxidante, sem qualquer diferença significativa em desfechos clínicos, tais como, duração do suporte inotrópico, ventilação mecânica e permanência na UTI⁷⁴

Ensaio clínico em choque séptico tem demonstrado também resultados confusos. Spies et al relataram que 45% dos pacientes que receberam NAC demonstraram aumento do consumo de oxigênio associado com aumento do pH da mucosa gástrica, melhora na função cardíaca e maior sobrevivência⁷⁵. Ao contrário, Peake et al, demonstraram significativa depressão da função cardiovascular após 24h associada com infusão de NAC⁷⁶. Em outro estudo, a administração de NAC melhorou a função respiratória e diminuiu o tempo de permanência na UTI sem efeitos hemodinâmicos significativos, e interessante, atenuou a produção de IL-8⁷⁷, a qual é uma citocina que atua como um importante mediador da lesão pulmonar na sepse, promovendo recrutamento e ativação de neutrófilos.

Emet et al demonstraram que infusões precoces de NAC em pacientes com sepse grave não afetaram níveis de citocinas, pH gástrico intramucoso, variáveis de oxigenação e hemodinâmicas e nem desfecho⁷⁸.

Recentemente, Hein et al, relataram que a administração de NAC diminuía a produção de hepática lactato, melhorava a perfusão do fígado e melhorava a função hepática em pacientes com choque séptico⁷⁹.

Até o momento, monoterapia com NAC parece não modificar dramaticamente a história natural do complexo de doença tais como SDRA e, sepse. Entretanto, reduzir o tempo para administração pode ser mais útil, parando o dano induzido pelo estresse oxidativo.

Em um modelo de choque endotóxico com ressuscitação volêmica, administração de NAC antes da endotoxina melhorou a extração de oxigênio, com aumento do fluxo sanguíneo regional, na vasculatura mesentérica, renal e femural⁸⁰. Entretanto, quando a infusão de NAC foi iniciada 12h após a administração de endotoxina, não houve melhora na hemodinâmica local ou regional, metabolismo ou extração de oxigênio a despeito de um aumento da concentração de glutathione⁸¹.

Durante a sepse existe acúmulo de peróxido de hidrogênio e ferro livre que são importantes para a geração de radicais hidroxil com conseqüente dano celular⁸². NAC isolado pode ter atividade pró-oxidante pela facilidade com interação com ferro e formação de peróxido de hidrogênio. O uso de Deferoxamina, um quelante de ferro, poderia ajudar a prevenir estes efeitos⁸³. Ritter et al⁸² demonstraram que este tratamento interfere com estresse oxidativo, reduzindo principalmente as atividades de SOD, a resposta inflamatória pulmonar e liberação de citocinas inflamatórias dos macrófagos alveolares. O demonstrado efeito da NAC + Deferoxamina na atividade da SOD parece ser importante, tendo em vista que muitos estudos demonstraram a relação de SOD extracelular com a diminuição do recrutamento de neutrófilos^{84,85}. Além de reduzir o dano oxidativo celular este esquema antioxidante reduz a resposta inflamatória, a disfunção mitocondrial e a mortalidade associada ao choque séptico⁸². Estes resultados somados a estudos prévios sustentam uma interferência do ferro nos efeitos terapêuticos da NAC em diferentes modelos de doença crítica^{82,86}.

Então, a geração de EAO durante a sepse pode ser responsável por diversas das alterações fisiopatológicas. As EAO podem levar diretamente a dano e morte celular,

provavelmente pela geração de radicais superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxil e peroxinitrito. Além disto, as EAO são indutores de resposta inflamatória diretamente ou por aumentar a expressão de genes de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão (via ativação de NF- κ B, AP-1 e rotas de quinases). As EAO também alteram a função mitocondrial, levando a desacoplamento da cadeia de transporte de elétrons, redução da produção de ATP, formação do poro de permeabilidade transitória e liberação de citocromo C. O dano celular pode ainda levar a ativação da PARS, com consumo de NAD e conseqüente redução da produção de ATP.

Embora a suplementação com ATX pareça ser a resposta lógica a níveis reduzidos de ATX, o benefício desta terapêutica ainda não foi claramente demonstrado. Muitas variáveis podem explicar as discrepâncias nos resultados clínicos: classe de drogas, dose e tempo de administração, diferenças na população de pacientes e tamanho das amostras.

Balanco oxidante-antioxidante envolve diferentes caminhos, e atualmente não existe uma droga ideal disponível para afetar todos eles. Teoricamente uma combinação de ATX com diferentes propriedades poderia ser melhor escolha do que monoterapia.

Tendo em vista que a resposta séptica é heterogênea e depende das características do hospedeiro e do patógeno, é razoável supor-se que alguns subgrupos de pacientes vão responder melhor do que outros a um tratamento individual. Até o momento nenhum estudo foi realizado para determinar subgrupos de indivíduos que respondam ou não a terapia antioxidante. Deste modo, o objetivo deste estudo foi determinar, em um modelo animal de sepse, se parâmetros plasmáticos, oxidativos ou inflamatórios, poderiam prever resposta a tratamento antioxidante, e se estes parâmetros poderiam prever mortalidade por sepse em humanos.

Objetivo

O presente estudo teve como objetivo geral determinar a relação entre parâmetros de estresse oxidativo, severidade de sepse e resposta ao tratamento com antioxidantes.

Objetivos específicos

Determinar as diferenças entre níveis plasmáticos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em pacientes com sepse, sepse grave e choque séptico,

Determinar as diferenças entre níveis plasmáticos de proteínas carboniladas em pacientes com sepse, sepse grave e choque séptico,

Determinar as diferenças entre a atividade da catalase e superóxido dismutase plasmáticas em pacientes com sepse, sepse grave e choque séptico,

Determinar se os parâmetros de estresse oxidativo podem prever mortalidade por sepse.

Determinar se os parâmetros de estresse oxidativo podem prever a resposta ao tratamento antioxidante em modelo animal de sepse.

Determinar se parâmetros plasmáticos inflamatórios podem prever resposta ao tratamento com antioxidantes.

Referências Bibliográficas

1. Parker MM, Parrilo LE. Septic shock: hemodynamics and pathogenesis. *J Am Med Assoc* 1983; 250: 3324-3332
2. Martin GS, Manino DM, Eathon S, Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348:1546-1554.
3. Barriere SL, Lowry SF. An overview of mortality risk prediction in sepsis. *Crit Care Med* 1995; 23: 376- 393.
4. Hoyert DL, Arias E, Smith BL, Murphy SL, Kochanek KD. Deaths final data from 1999. *National vital statistics report CDC1999*; 49: 8.
5. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29:1303–1310.
6. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulmé R, Lepage E, Le Gall J. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Int Care Med* 2002; 28: 108-121.
7. Annane D, Aegerter P, Jars-Guinestre MC, Guidet B. Current Epidemiology of Septic Shock The CUB-Re´a Network. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 168: 165–172.
8. Silva E, Pedro MA, Sogayar ACB, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care Med* 2004; 8: R251-R260.
9. Silva E, Pedro MA, Sogayar AMCD. Brazilian sepsis epidemiological study (BASES): preliminary results. *Crit Care* 2004; 8: R251-260.
10. Sales Jr JA, David CM, Hatum R, Souza PCSP, Japiassu A, Pinheiro CTS, Friedman G, Silva OB, Dias MD, Koterba E, Dias FS, Piras C. Sepsis Brasil:

Estudo epidemiológico da sepse em unidade de Terapia Intensiva Brasileiras.
Revista Brasileira de Terapia Intensiva 2006; 18: 9 – 17.

11. American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee. Definitions of sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992;101: 1644-1655.
12. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 1990; 49: 186-196.
13. Vincent JL, Abraham E. The Last 100 years of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 256–263
14. Rabuel C, Mebazza A. Septic shock: a heart story since the 1960's. *Intensive Care Med* 2006; 32: 799-807.
15. Fink MP, Evans TW. Mechanisms of organ dysfunction in critical illness: report from a Round Table Conference held in Brussels. *Intensive Care Med* 2002; 28(3):369-375.
16. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420: 885-891.
17. Bochud PY, Calandra T. Science, medicine, and the future: Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment *BMJ* 2003; 326: 262-266.
18. Ulevitch RJ, Tobias PS. Recognition of gram-negative bacteria and endo-toxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 19-22.
19. Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, Kravchenko VV, Akamatsu Y, et al. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity* 1994; 1: 509–516.
20. Devitt, A. *et al.* Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 1998; 392: 505–509.

21. Shimazu R. et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 1999; 189: 1777–1782.
22. Das UN. Critical advances in septicemia and septic shock. *Crit Care* 2000; 4: 290-296.
23. Szabo C. Role of nitric oxide in endotoxic shock. An overview of recent advances. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 30: 422-425.
24. Zhang H, Slutsky AS, Vincent JL. Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction. *Intensive Care Med* 2000; 26: 474-476.
25. Gutteridge JMC, Mitchell J. Redox imbalance in the critically ill. *Br Med Bull* 1999; 55: 49-75.
26. Macdonald J, Galley HF, Webster NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth* 2003; 90: 221-232.
27. Crimi E, Sica V, Willians-Ignarro S, Zhang H, Slutsky AS, Ignarro LJ, Napoli C. The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Rad Biol Med* 2006; 40: 398–406.
28. Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 1999; 11:1-14.
29. Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD .Extracelular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Rad Biol Med* 2003; 35(3): 236–256.
30. Fujimura N, Sumita S, Aimonio M, Masuda Y, Schichinohe Y, Narimatsu E, Namiki A. Effect of free radical scavengers on diaphragmatic contractility in septic peritonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2159-2165.
31. Callahan LA, Nethery D, Stofan D, DiMarco A, Supinski G. Free radical induced contractile protein dysfunction in endotoxin induced sepsis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24: 210-217.

32. Macarthur H, Westfall TC, Riley DP, Misko TP, Salverini D. Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9753-9758.
33. Basu S, Eriksson M. Oxidative injury and survival during endotoxemia. *FEBS Lett* 1998; 438: 159-160.
34. Chang CK, Llanes S, Schumer W. Inhibitory effect of DMSO on nuclear factor-kB activation and intercellular adhesion molecule 1 gene expression in septic rat. *J Surg Res* 1999; 82: 294-299.
35. Chang CK, Albarillo MV, Schumer W. T. Therapeutic effect of dimethyl sulfoxide on ICAM-1 gene expression and activation of NF-kappaB and AP-1 in septic rats. *J Surg Res* 2001; 95: 181-187.
36. Ritter C, Andrades M, Frota Junior ML, Bonatto F, Pinho RA, Polydoro M, Klamt F, Pinheiro CT, Menna-Barreto SS, Moreira JC, Dal-pizzol F. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Intensive Care Med* 2003; 29:1782-1789.
37. Andrades M, Ritter C, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Oxidative parameters during non-lethal and lethal sepsis development. *J Surg Res* 2005; 125(1): 68-72.
38. Takeda K, Shimada Y, Amano M, Sakai T, Okada T, Yoshiya I. Plasma lipid peroxides and α -tocopherol in critically ill patients. *Crit Care Med* 1984; 12: 957-959.
39. Motoyama T, Okamoto K, Kukita I, Hamaguchi M, Kinoshita Y, Ogawa H. Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 2003 31:1048 –1052.
40. Vega JMA, Diaz J, Serrano E, Carbonell LF. Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 2002; 30: 1782-1786.

41. Winterbourn CC, Buss I H, Chan TP, Plank LD, Clark MA, Windsor JA. Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Crit. Care Med.* 2000; 28:143– 149.
42. Ritter C, Andrades M, Guerreiro M, Zavaschi L, Gelain DP, Souza LF, Ribeiro C, Clausell N, Menna-Barreto S, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Plasma oxidative parameters and mortality in patients with severe burn injury. *Intensive Care Med* 2003; 29: 1380-1383.
43. Mishra V, Baines M, Wenstone R, Shenkin A. Markers of oxidative damage, antioxidant status and clinical outcome in critically ill patients. *Ann Clin Biochem* 2005; 42: 269-276.
44. Borrelli E, Roux-Lombard P. Plasma concentration of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Crit Care Med* 1996; 24: 392-397.
45. Schorah CJ, Downin C, Piripitsi A, Gallivan L, Al-Hazaa AH, Sanderson MJ, Bodenham A. Total vitamin C, ascorbic acid, and dehydroascorbic acid concentrations in plasma of critically ill patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 1996; 63:760– 765.
46. Curran FJ, Sattar N, Talwar D, Baxter JN, Imrie CW. Relationship of carotenoid and vitamins A and E with the acute inflammatory response in acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* 2000; 87:301– 305.
47. Warner A, Bencosme A, Healy D, Verme C. Prognostic role of antioxidant enzymes in sepsis: preliminary assessment. *Clin Chem* 1995; 41(6 Pt 1):867-871.
48. Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Webster NR. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med* 1995; 23(4):646-651.

49. Ortolani O, Conti A, Gaudio AR, Moraldi E, Cantini Q, Novelli G. The effect of glutathione and N-acetylcysteine on lipoperoxidative damage in patients with early septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1907-1911.
50. Winterbourn CC, Buss H, Chan TP, Plank LS, Clark MA, Windsor JA. Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Crit Care Med* 2000; 28: 143-149.
51. Galley HF, Howde PD, Walker BE, Webster NR. The effects of intravenous antioxidants in patients with septic shock. *Free Rad Biol Med* 1997; 23: 768-774.
52. Ogilvie AC, Groeneveld AB, Straub JP, Thijs LG. Plasma lipid peroxides and antioxidants in human septic shock. *Intensive Care Med* 1991; 17:40-44.
53. Galley HF. Elevated concentrations in patients with sepsis syndrome. *Intensive care med* 1996; 22: 226-229.
54. Galley HF, Davies MJ, Webster NR. Xanthine oxidase activity and free radical generation in patients with sepsis syndrome. *Crit. Care Med.* 1996; 24: 1649–1653.
55. Angstwurm MW, Schottdorf J, Schopohl J, Gaertner R. Selenium replacement in patients with severe systemic inflammatory response syndrome improves clinical outcome. *Crit Care Med* 1999; 27: 1807-1813.
56. Remick DG, Bolgos GE, Siddiqui J. Inflammatory status in sepsis alters efficacy of interleukin-18 binding protein therapy. *Crit Care Med* 2003; 31: 2096–2101.
57. Vulcano M, Meiss RP, Isturiz MA. Deferoxamine reduces tissue injury and lethality in LPS-treated mice. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22: 635-644.
58. Hamburger SA, McCay PB. Endotoxin-induced mortality in rats is reduced by nitrones. *Circ Shock* 1989; 29: 329-334.
59. Masini E, Cuzzocrea S, Mazzon E. Protective effects of M40403, a selective superoxide dismutase mimetic, in myocardial ischaemia and reperfusion injury in vivo. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 905–917.

60. Salvemini D, Riley DP, Lennon PJ. Protective effects of a superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite decomposition catalysts in endotoxin-induced intestinal damage. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 685–692.
61. Spaten HD, Diltioer MW, Nguyen DN, Hendrix I, Huygens LP. Effects of n-acetylcysteine on microalbuminuria and organ failure in acute severe sepsis: results of a pilot study. *Chest* 2005; 127 1413-1419.
62. Walsh TS, Lee A. N-Acetylcysteine administration in the critically ill. *Intens. Care Med.* 1999; 25: 432–434.
63. Spaten H. N-acetylcysteine in clinical sepsis: a difficult marriage. *Critical Care* 2004; 8: 229-230.
64. Hsu BG, Lee Rp, Yang FL, Harn HJ, Chen HI. Post-treatment with NAC ameliorates endotoxin shock induced organ damage in conscious rats *Life sciences* 2006; 79: 2010-2016.
65. Paterson RL, Galley HF, Webster NR. The effect of Nacetylcysteine on nuclear factor-kappa B activation, interleukin-6,interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. *Crit. Care Med.* 2003; 31: 2574–2578.
66. Heller AR, Groth G, Heller SC, et al: N-acetylcysteine reduces respiratory burst but augments neutrophil phagocytosis in intensive care unit patients. *Crit Care Med* 2001; 29: 272-276.
67. Rank N, Michel C, Haertel C, et al: NAC increases liver blood flow and improves liver function in septic shock patients: results of a prospective, randomized, double-blind study. *Critic Care Med* 2000; 28: 3799-3807.
68. Laurent T, Markert M, Feihl F, Schaller MD, Perret C. Oxidant–antioxidant balance in granulocytes during ARDS: effect of N-Acetylcysteine.*Chest* 1996; 109:163–166.

69. Ortolani O, Conti A, De Gaudio AR, Masoni M, Novelli G. Protective effects of N-acetylcysteine and rutin on the lipid peroxidation of the lung epithelium during the adult respiratory distress syndrome. *Shock* 2000; 13:14– 18.
70. Jepsen S, Herlevsen P, Knudsen P, Bud MI, Klausen NO. Antioxidant treatment with N-acetylcysteine during adult respiratory distress syndrome: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Crit. Care Med.* 1992; 20: 918– 923.
71. Domenighetti G, Suter PM, Schaller MD, Ritz R, Perret C. Treatment with N-acetylcysteine during acute respiratory distress syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *J. Crit. Care* 1997; 12: 177–182.
72. Bernard GR, Wheeler AP, Arons MM, Morris PE, Paz HL, Russell JA, Wright PE. A trial of antioxidants N-acetylcysteine and procysteine in ARDS. The Antioxidant in ARDS Study Group. *Chest* 1997; 112: 164– 172.
73. Suter PM, Domenighetti G, Schaller MD, Laverriere MC, Ritz R, Perret C. N-acetylcysteine enhances recovery from acute lung injury in man: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Chest* 1994; 105: 190– 194.
74. Molnar Z, MacKinnon KL, Shearer E, Lowe D, Watson I. D. The effect of N-acetylcysteine on total serum anti-oxidant potential and urinary albumin excretion in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 1998; 24: 230–235.
75. Spies CD, Reinhart K, Witt I, Meier-Hellmann A, Hannemann L, Bredle DL, Schaffartzik W. Influence of N-acetylcysteine on indirect indicators of tissue oxygenation in septic shock patients: results from a prospective randomized, double-blind study. *Crit. Care Med.* 1994; 22: 1738– 1746.
76. Peake SL, Moran JL, Leppard PI. N-Acetyl-L-cysteine depresses cardiac performance in patients with septic shock. *Crit. Care Med.* 1996; 24:1302– 1310.

77. Spapen H, Zhang H, Demanet C, Vleminckx W, Vincent JL, Huyghens L. Does N-acetyl-L-cysteine influence cytokine response during early human septic shock? *Chest* 1998; 113:1616–1624.
78. Emet S, Memis D, Pamukçu Z. The influence of NAC infusion on cytokine levels and gastric intramucosal pH during severe sepsis. *Critical Care* 2004; 8:R172-179.
79. Hein OV, Ohring R, Schilling A, Oellerich M, Armstrong VW, Kox WJ, Spies C. N-acetylcysteine decreases lactate signal intensities in liver tissue and improves liver function in septic shock patients, as shown by magnetic resonance spectroscopy: extended case report. *Crit. Care* 2004; 8: R66–R71.
80. Zhang H, Spapen H, Nguyen DN, Rogiers P, Bakker J, Vincent JL. Effects of N-acetyl-L-cysteine on regional blood flow during endotoxic shock. *Eur. Surg. Res.* 1995; 27: 292–300.
81. Vassilev D, Hauser B, Bracht H, Ivanyi Z, Schoaff M, Asfar P, Vogt J, Wachter U, Schelzig H, Georgieff M, Bruckner UB, Radermacher P, Froba G. Systemic, pulmonary, and hepatosplanchnic effects of N-acetylcysteine during long-term porcine endotoxemia. *Crit. Care Med.* 2004; 32: 525– 532.
82. Ritter C, Andrades ME, Reinke A, Menna-Barreto S, Moreira JC, Dal-pizzol F. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit Care Med.* 2004; 32:342-349.
83. Pinho R, Silveira PCL, Silva LA, Streck EL, Dal-Pizzol F, Moreira JCF. N-Acetylcysteine and Deferoxamine reduce pulmonary oxidative stress and inflammation in rats after coal dust exposure. *Environ Res* 2005; 99(3): 355-360.
84. Bowler RP, Nicks M, Tran K, Tanner G, Chang LY, Young SK, Worthen GS. Extracellular superoxide dismutase attenuates lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation. *Am J Resp Cell Mol Biol* 2004; 31(4): 432-439.

- 85.** Russel P, Bowler RP, Crapo JD. Oxidative Stress in Airways Is There a Role for Extracellular Superoxide Dismutase? *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: S38–S43.
- 86.** Ritter C, Reinke A, Andrades M, Martins MR, Rocha J, Menna-Barreto S, Quevedo J, Moreira JCF, Dal-Pizzol F. Protective effect of N-acetylcysteine and deferoxamine on carbon tetrachloride-induced acute hepatic failure in rats. *Crit Care Med* 2004; 32: 2079-2083.

Plasma superoxide dismutase predicts response to antioxidant treatment in an animal model of sepsis

OBJECTIVE: determine the relationship between oxidative stress parameters, sepsis severity and treatment response to antioxidants.

MATERIALS AND METHODS: were included consecutive patients admitted on ICU at a tertiary care Hospital with sepsis, severe sepsis or septic shock. The patients were evaluated, blood samples were collected immediately after study inclusion (12h maximum after sepsis diagnosis). We determined plasma levels of thiobarbituric acid reactive species (TBARS), protein carbonyls, superoxide dismutase (SOD) and catalase activities and correlate it to clinical parameters. To determine the relation between oxidative parameters and response to antioxidant treatment we used the cecal ligation and perforation (CLP) model of sepsis, using or not antioxidants (n-acetylcysteine plus deferoxamine) 3 or 12 hours after CLP.

RESULTS: non-survivor septic patients presented higher protein carbonyls and SOD activity when compared to survivor patients. These parameters were correlated to APACHE II and MODS in our sample. In addition, plasma SOD levels predicted response to antioxidant treatment in the CLP model, both 3 and 12 hours after sepsis induction.

CONCLUSION: Oxidative parameters are correlated to severity and outcome in septic patients and could predict response to antioxidant treatment in the CLP model.

Sepsis and the consequences of the response to sepsis are the most causes of mortality in intensive care units¹. The incidence of sepsis increased from 82,7 cases per 100000 habitants in 1979 to 240,4 per 100000 habitants in 2000². The overall hospital mortality rate was among 28 to 60% depending on sepsis severity^{3,4,5,6,7}.

Several molecular mechanisms of inflammation and celular damage have been implicated in the pathogenesis of sepsis, including those related to over generation of cytokines, eicosanoids, and reactive oxygen species (ROS)⁸. ROS are believed to be important mediators of celular injury contribuiting to the development and mortality of sepsis^{9,10}, but to date none convincing result from clinical trials were obtained using antioxidants as adjuvant treatment of sepsis¹¹.

Since the septic response is heterogeneous and depends on host and pathogen characteristics it is reasonable to suppose that some subgroups of patients will respond better than others to an individual treatment, and this was observed clinical trials¹². In this way, in a recently published study Dr. Remick and cols determined, in an animal model of sepsis, that IL18 binding protein treatment was effective only in the subgroup of animals with higher IL-6 plasma levels¹³. We had demonstrated that some plasmatic oxidative parameters, mainly superoxide dismutase (SOD), could be an earlier marker of sepsis mortality in an animal model of sepsis¹⁰, and that this enzyme could be a source of free radical generation during sepsis development⁹. In addition, several human studies determined the value of plasma oxidative parameters as prognostic markers in septic patients^{14,15,16,17}. To date none study was performed to determine subgroups of individuals that respond or not to antioxidant treatment. Thus the aim of this study was to determine, in an animal model of sepsis, if plasma inflammatory or oxidative parameters could predict response to antioxidant treatment, and if these parameters could predict sepsis mortality in humans.

Material and Methods

All procedures in this study were performed accordance with National Institutes of Health guidelines and with the approval of the local ethics committee. All patients or their parents gave their informed consent prior to their inclusion in the study.

Part 1 - Animal model of sepsis

Male Wistar rats 2–3 months old, subjected to CLP as previously described¹⁸, were used in this study. Rats were anesthetized with a mixture of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), given intraperitoneally. Under aseptic conditions, a 3-cm midline laparotomy was performed to allow exposure of the cecum with adjoining intestine. The cecum was tightly ligated with a 3.0 silk suture at its base, below the ileocecal valve, and was perforated once with a 14-gauge needle. The cecum was then gently squeezed to extrude a small amount of feces from the perforation site. The cecum then was returned to the peritoneal cavity and the laparotomy was closed with 4.0 silk sutures. Animals were resuscitated with normal saline (50 mL/kg subcutaneous) immediately after and 12 hrs after CLP. All animals were returned to their cages with free access to food and water.

Experimental Protocols

Since we had demonstrated previously that early plasma SOD activity could predict mortality in the CLP model^{9,10}, we here determine the correlation between early plasma SOD activity with late oxidative damage and neutrophil infiltration in the lung, kidney and liver (described subsequently). To this setting of experiments 30 rats were made septic by the CLP procedure, 15 animals were sham operated and 15 animals were submitted to CLP with fluid resuscitation (saline at 50 mL/kg immediately after and 12 hrs after CLP). Three hours after CLP blood was collected from the caudal vein to the determination of superoxide dismutase activity. Twenty four hours later the rats were killed by decapitation

followed by the harvesting of samples from the lung, liver and kidney which were immediately stored at -70°C until assayed for myeloperoxidase activity, thiobarbituric acid reactive species (TBARS) formation and protein carbonyls as detailed subsequently.

Survival Experiments

To determine if early plasma SOD activity could predict the response to antioxidant treatment survival (the protocol was described in detail by our group in reference 19)¹⁹ was tested in a separate cohort of animals. In a first protocol, animals exposed to laparotomy were randomly assigned to receive: group 1, sham operated; group 2, submitted to CLP with “basic support” (saline at 50 mL/kg immediately after and 12 hrs after CLP plus ceftriaxone at 30 mg/kg and clindamycin 25 mg/kg every 6 hrs starting 3 hours after sepsis induction); group 3, same as group 2 plus NAC (20 mg/kg) 3 hrs, 6 hrs, and 12 hrs after CLP plus DFX (20 mg/kg) starting 3 hrs after CLP with a subcutaneous injection. In this experiment three hours after CLP blood was collected from the caudal vein to the determination of superoxide dismutase activity and TNF- α concentration.

In a second set of experiments we determined if antioxidant treatment could be delayed to 12 hours after sepsis induction using early SOD activity to predict response to treatment. The animals were challenged with laparotomy and divided in three groups: group 1, sham operated; group 2, submitted to CLP with “basic support” (saline at 50 mL/kg immediately after and 12 hrs after CLP plus ceftriaxone at 30 mg/kg and clindamycin 25 mg/kg every 6 hrs starting 12 hours after sepsis induction); group 3, same as group 2 plus NAC (20 mg/kg) 3 hrs, 6 hrs, and 12 hrs after CLP plus DFX (20 mg/kg) starting 12 hrs after CLP with a subcutaneous injection. In this experiment twelve hours after CLP blood was collected from the caudal vein to the determination of superoxide dismutase activity. In these experiments mortality rate of the animals was recorded over a 5-day period.

Part 2 - Human studies

To determine if oxidative plasma parameters that could predict outcome in the CLP model could also predict outcome in humans with sepsis we designed a prospective observational study in an Intensive Care Unit at a University Hospital. 96 critically ill patients admitted over a 12-month period to the intensive care unit at a tertiary care University Hospital were enrolled in this study. Patients were assigned to groups according to the diagnosis of sepsis (n=21), severe sepsis (n=35) or septic shock (n=40) according to the Consensus Conference for Sepsis²⁰ by two blinded intensivists. At the time of sepsis diagnosis heparinized blood samples were collected putted immediately on ice and stored at -80°C to the determination of oxidative damage parameters (see above). In parallel to the sample collection for plasma marker analysis, clinical data relevant for the study were recorded daily until ICU discharge. Exclusion criteria were: age bellow 18, hepatic or renal insufficiency, neoplasia receiving chemo or radiotherapy, immunodeficiency. The management of patients followed the institution's standard protocol, without interference from the investigators.

Measurements

Thiobarbituric Acid Reactive Species. As an index of oxidative stress we used the formation of TBARS during an acid-heating reaction as previously described²¹. Briefly, the samples were mixed with 1 mL of trichloroacetic acid 10% and 1 mL of thiobarbituric acid 0.67% and then heated in a boiling water bath for 15 mins. TBARS was determined by the absorbance at 535 nm using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as an external standard. To minimize peroxidation during the assay procedure, butylated hydroxytoluene was added to the TBA reagent mixture. Results are expressed as malondialdehyde equivalents per milligram of protein (Lowry assay).

Protein Carbonyls. The oxidative damage to proteins was assessed by the determination of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine as previously described²². Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and redissolved in dinitrophenylhydrazine, and the absorbance was read at 370nm.

Myeloperoxidase Assay. As an index of neutrophil infiltration, we measured myeloperoxidase (MPO) activity in tissues homogenates. Tissues were homogenized (50 mg/mL) in 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide in 10 mM 3-N-morpholinopropanesulfonic acid and centrifuged at 15,000 \times g for 40 mins. The suspension was then sonicated three times for 30 secs. An aliquot of the supernatant was mixed with a solution of 1.6 mM tetramethylbenzidine and 1 mM hydrogen peroxide. Activity was measured spectrophotometrically as the change in absorbance at 650 nm at 37°C, using a Spectramax microplate reader²³. Results are expressed as milliunits of MPO activity per milligram of protein, which were determined with the Bradford assay.

Measurement of Plasma Superoxide Dismutase and Catalase Activities. Catalase (CAT) activity was measured by the rate of decrease in the hydrogen peroxide absorbance at 240 nm and expressed as U/mg of protein, as described elsewhere²⁴. Superoxide dismutase (SOD) activity was assayed by measuring the inhibition of adrenaline auto-oxidation, as previously described²⁵.

Measurement of Plasma TNF- α Concentration. Commercial ELISA kits were used to the detection of TNF- α (Quantikine, R&D Systems Europe Ltda, Abingdon, UK).

Reagents

Thiobarbituric acid, CAT, SOD, dinitrophenylhydrazine, adrenaline, were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO). NAC was purchased from Zambon Laboratórios Farmacêuticos (Brazil). DFX was purchased from Novartis (Brazil).

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation for variables with normal distribution. For repeated measurements a two-factorial analysis of variance was performed. Comparison between means was carried out using the Newman-Keuls test. Multivariate analyses were performed to control for potential confounding factors. Results are reported as unadjusted means. Pearson's correlation test was used to study associations between marker levels and other variables. Differences with p values below 0.05 were considered significant.

Results

We demonstrated that after CLP, but not in sham-operated animals (data not shown), early plasma SOD activity (collected 3 hours after CLP) positively correlated to late oxidative damage (determined 24 hours after CLP) in the lung, liver and kidney (Figure 1 A-F). In addition, plasma SOD activity correlated to myeloperoxidase activity in the lung and kidney, but not in the liver (Figure 2 A-C). Considering that plasma SOD activity seemed to correlate to late oxidative damage and inflammatory response, and that we previously demonstrated that plasma SOD activity could predict mortality in the CLP model, we tried to determine if plasma SOD activity could predict response to treatment in the CLP model. Thus to determine if plasma SOD activity could predict treatment response in the CLP models we divided animals according to treatment in two groups: 1. SOD > 10 U/mg protein 2. SOD < 10 U/mg protein (these values were determined analyzing ROC curves). There were no differences in the mortality when comparing basic support to basic support plus antioxidants in the animals with plasma SOD activity higher than 10 U/mg protein (Figure 3A). In contrast, animals with plasma SOD activity lower than 10 U/mg protein who received antioxidants presented higher survival when compared to animals that receive only basic support (Figure 3B). We tested whether early TNF- α could predict

response to antioxidant treatment, but we failed to detect such association. Independent of plasma TNF- α levels (higher or lower than 1200 pg/mg protein) animals that received antioxidants presented higher survival rates when compared to basic support alone (Figure 4A and figure 4B). Thus, since using this cut-off values TNF- α could predict outcome in this model (Figure 4C) we supposed that the capacity to plasma SOD activity predicts response to antioxidant treatment was not only related only to the severity of the disease. When antioxidants were administered 12 hours after CLP the mortality was not significantly different from the isolate use of basic support (Figure 5A). In the subgroup of animals with plasma SOD activity lower than 10 U/mg protein, but not in the subgroup with plasma SOD activity higher than 10U/mg protein, antioxidant treatment was superior to the isolate use of basic support (Figure 5B and 5C).

To determine if plasma SOD activity could have prognostic value in human sepsis we performed an observational study in humans as described under Material and Methods section. The population comprised 96 patients: 45 survivors and 51 non-survivors, 21 had sepsis, 35 severe sepsis and 40 septic shock on the presentation to study. Epidemiological and oxidative damage parameters were present in Table 1. As expected clinical scores (APACHE II and MODS) of disease severity could predict outcome in our sample (Table 1). In addition, plasma carbonyls and SOD activity, but not plasma TBARS and catalase activity, were significantly higher in non-survivors when compared to survivors. Plasma carbonyl levels presented a significant, but weak correlation with APACHE II ($p=0.005$, $r=0.282$) and MODS ($p=0.04$, $r=0.211$), but did not correlate with SOD activity. SOD activity significantly correlated with APACHE II ($p<0.001$, $r=0.573$) and MODS ($p<0.001$, $r=0.457$). In addition, SOD activity presented the higher area under the ROC curve (0.917) when compared to APACHE II (0.838), MODS (0.631) and carbonyls (0.648) (Figure 6). Using a cut-off of 5.5 U/mg protein plasma SOD activity could predicts outcome with a sensitivity of 90% and specificity of 80%. Since extracellular SOD (EC-

SOD) could be related to the control of the vascular tone we determined the correlation between oxidative damage parameters and the use of vasopressor. Protein carbonyls and SOD activity were significantly higher in patients that used vasopressor when compared to patients that did not use it (Table 2), however only SOD activity (Figure 7), but not protein carbonyls (data not shown), significantly correlated with the higher norepinephrine dose used by septic patients.

Discussion

Patients with sepsis represent a heterogeneous group of individuals. Within this patient population are individuals who have mounted an excessive inflammatory response to the septic challenge and will die, whereas others have an appropriate inflammatory response and will survive. The CLP model can be used to explore these individual differences and can be used to test the potential usefulness of newly described immunotherapeutics. The basic hypothesis is that some hosts have an appropriate response to sepsis that should not be altered, whereas other hosts have an inappropriate response that needs to be modified to improve outcome. We had previously demonstrated that SOD activity was the earliest oxidative parameters to predict outcome in rats^{9,10}. We here demonstrated that early plasma SOD activity correlated with a late oxidative damage. In addition, our data show that early or late administration of antioxidants improved survival in those rats with lower SOD activity suggesting that antioxidants were effective in animals with less severe sepsis. In contrast, when dividing animals using plasma TNF- α levels we could not demonstrate a subgroup that responds differently to antioxidant treatment. This suggests that the ability of SOD to predict response to antioxidant treatment was not related only to sepsis severity. Multiple large-scale clinical trials using immunomodulators have not improved mortality rate (reviewed in Ref. 26)²⁶. Our results provide one potential explanation for these failed clinical trials, since all patients received

the same immunotherapy regardless of their status. This was also true to IL-18 binding protein, in an elegant article Remick and cols demonstrated in the CLP model of rodent sepsis that the response to this treatment depends on the immune status of the animals¹³. It is possible that similar results would have been obtained with other immunomodulating therapies such as inhibition of tumor necrosis factor. Specifically, overall survival may not be improved but specific subgroups may benefit.

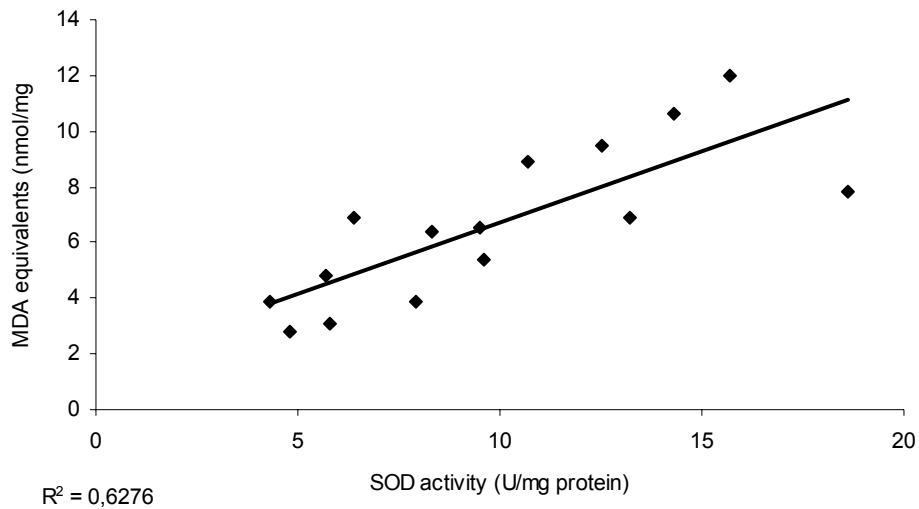
The results from the CLP model were reinforced by the finding that plasma SOD activity seemed to be superior, when compared to other markers of oxidative damage and clinical scores of severity, to predict outcome in human sepsis. We could only find one published article that demonstrated the role of plasma SOD activity in the prognosis of sepsis patients¹⁴. These authors demonstrated that SOD activity was superior to CAT activity to the prediction of outcome in human sepsis. In our sample catalase and TBARS were not able to predict outcome and did not correlate to scores of severity, differently from previously published data¹⁵. Some few studies compared different oxidative parameters and its relation to the severity and outcome from sepsis. Winterbourn and cols demonstrated that protein carbonyls were a better marker of disease severity when compared to TBARS¹⁶. Goode and cols demonstrated a decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock, but did not present a direct comparison between these markers¹⁷. In addition, patients admitted to the intensive care unit with criteria of systemic inflammatory response syndrome had a more severe oxidative stress than patients without this syndrome, but again this study did not compare the different oxidative markers²⁷. Thus our data provided some new information in the use of oxidative markers, mainly plasma SOD activity, as an important biomarker in human sepsis.

The physiopathological significance of the observed higher plasma SOD activity, its relation to sepsis severity and prediction of response to antioxidant treatment was

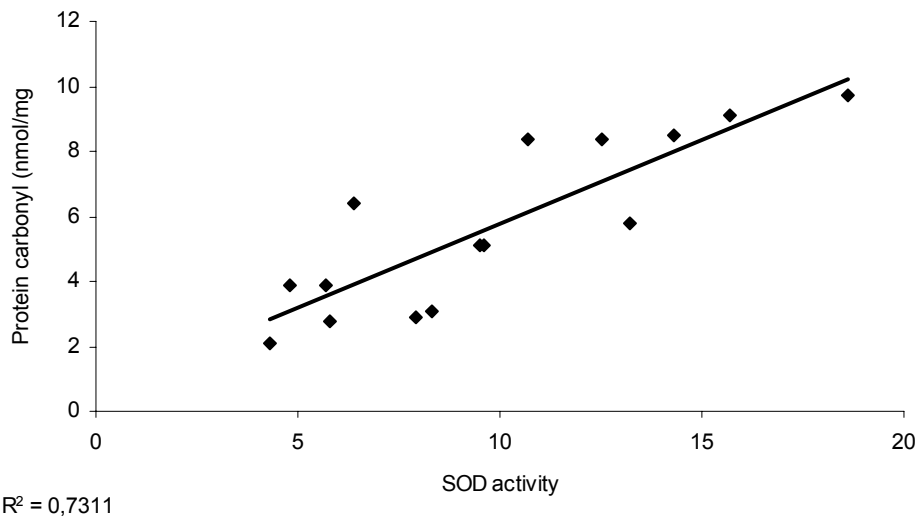
uncertain. An important role for reactive oxygen and nitrogen species in the pathogenesis of ischemia/reperfusion injury has been demonstrated by numerous studies. The precise mechanism by which extracellular (EC)-SOD protects against ischemia-reperfusion injury has yet to be resolved. Most current theories support the idea that by scavenging superoxide, EC-SOD protects NO bioactivity²⁸. Several recent studies have suggested that regulation of NO production and EC-SOD expression may be tightly associated (reviewed in ref 30)³⁰. For example, findings of one study showed the simultaneous elevation of both iNOS and EC-SOD expression in human and rabbit atherosclerotic lesions³⁰. The role of EC-SOD in the pathogenesis of acute lung injury has been investigated in mouse models expressing altered levels of EC-SOD. Mice null for EC-SOD were phenotypically normal until stressed³¹. However, exposure of EC-SOD-null mice to > 99% oxygen caused significant reduction in viability and an earlier onset of severe lung edema as compared to wild-type mice. This suggests that, under normal physiological conditions, the animals are capable of compensating for the lack of EC-SOD; but, when exposed to oxidative stress, the mice are unable to compensate and show increased sensitivity³¹. Furthermore, the EC-SOD-transgenic mice displayed significantly fewer neutrophils in the lungs after exposure to hyperoxia, suggesting that the presence of EC-SOD can attenuate the acute inflammation associated with hyperoxic lung injury³². Neutrophil degranulation during the progression of acute respiratory distress syndrome (ARDS) released a variety of proteolytic enzymes into the extracellular space. A recent study by McCord and coworkers³³ has found that activated neutrophils are capable of causing partial proteolysis of rabbit EC-SOD in vitro, resulting in a diminished affinity of EC-SOD for the endothelial surface. This suggests that reduced affinity of EC-SOD for heparin in ARDS may result in a loss of antioxidant protection and exacerbation of this condition. This is supported by the fact that plasma EC-SOD is elevated in patients with ARDS³³. In addition, we had previously demonstrated that an increased SOD activity could contribute to oxidative

damage in several organs after sepsis in the CLP model¹⁹. Thus, we suggested that SOD activity was not only a severity marker, since TNF- α could not predict antioxidant response in the CLP model, but could reflect alterations in the oxidant / antioxidant balance that were not addressed in the present study.

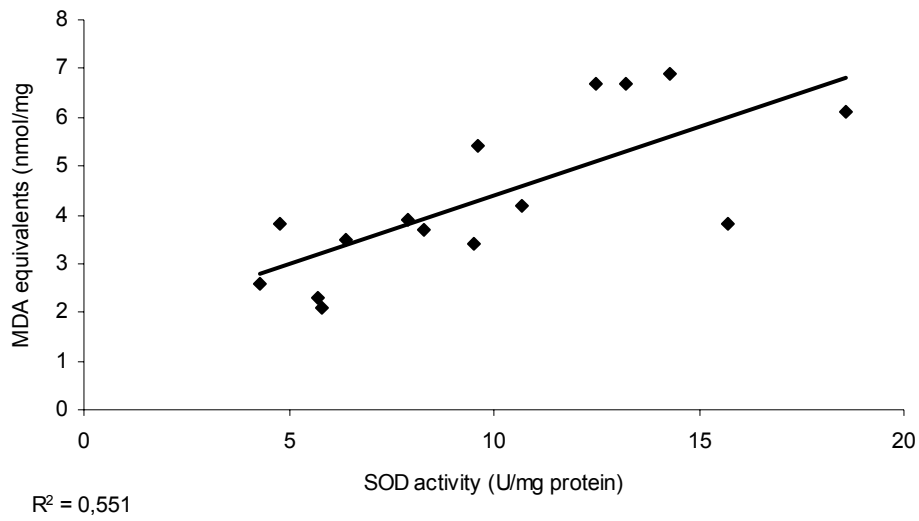
Figure 1 A-F: Correlation between early plasma SOD activity and late oxidative damage in the liver, lung and kidney



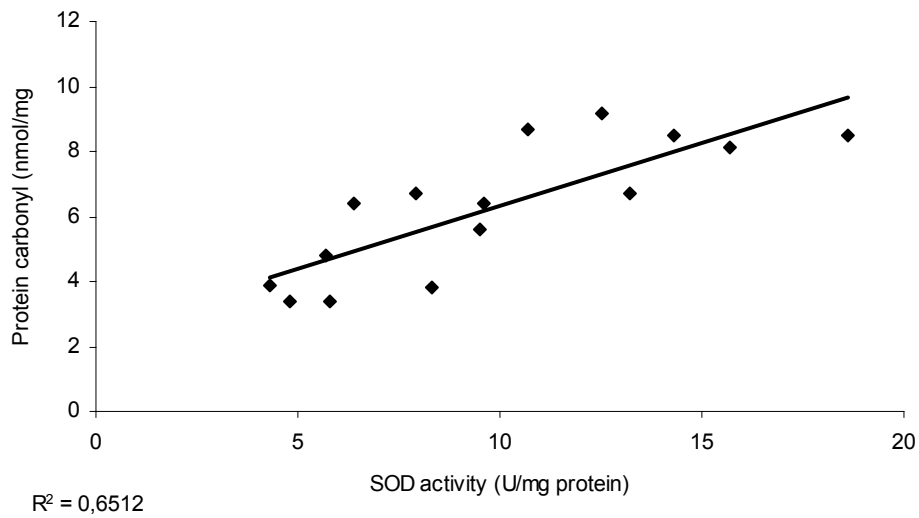
1 A: Correlation between early plasma SOD activity and lipid peroxidation in the liver



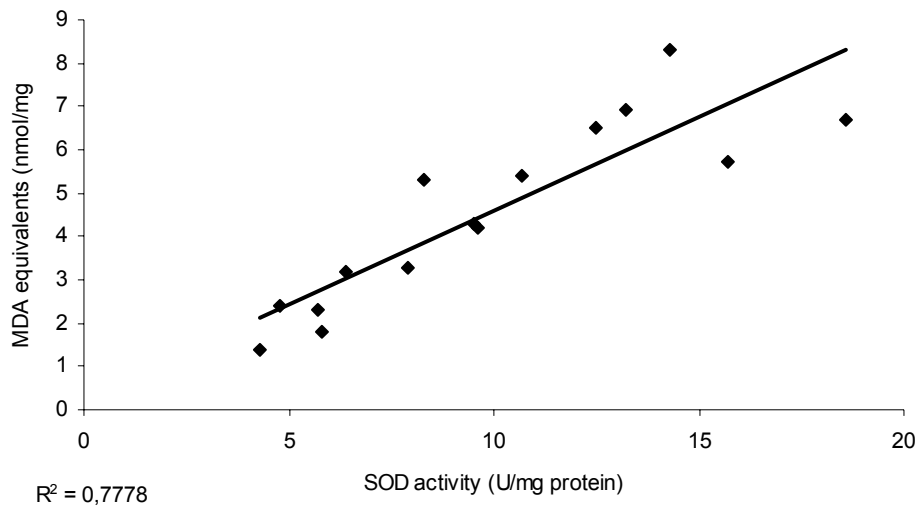
1 B: Correlation between early plasma SOD activity and oxidative damage to proteins in the liver



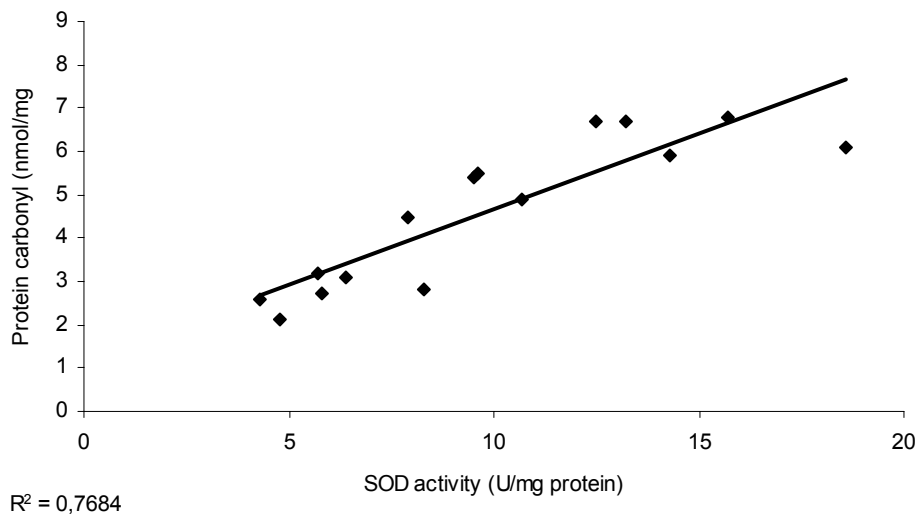
1 C: Correlation between early plasma SOD activity and lipid peroxidation in the lung



1 D: Correlation between early plasma SOD activity and oxidative damage to proteins in the lung

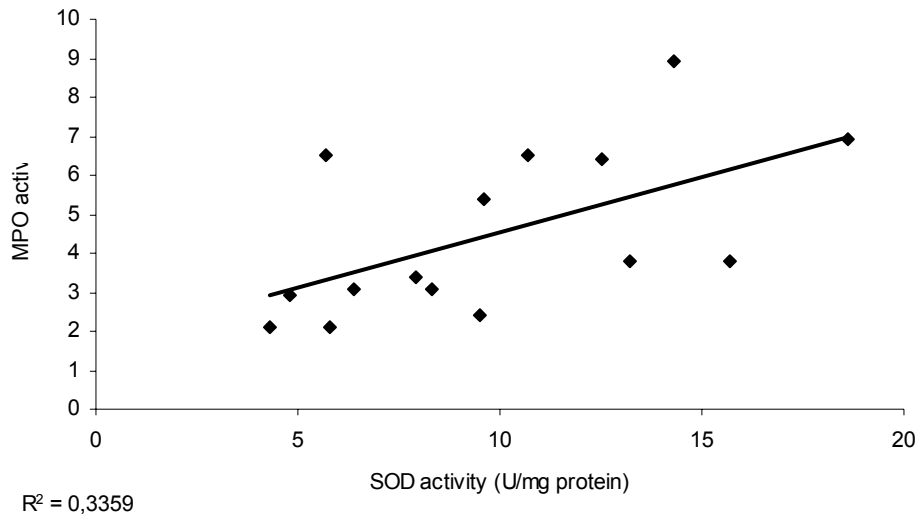


1 E: Correlation between early plasma SOD activity and lipid peroxidation in the kidney

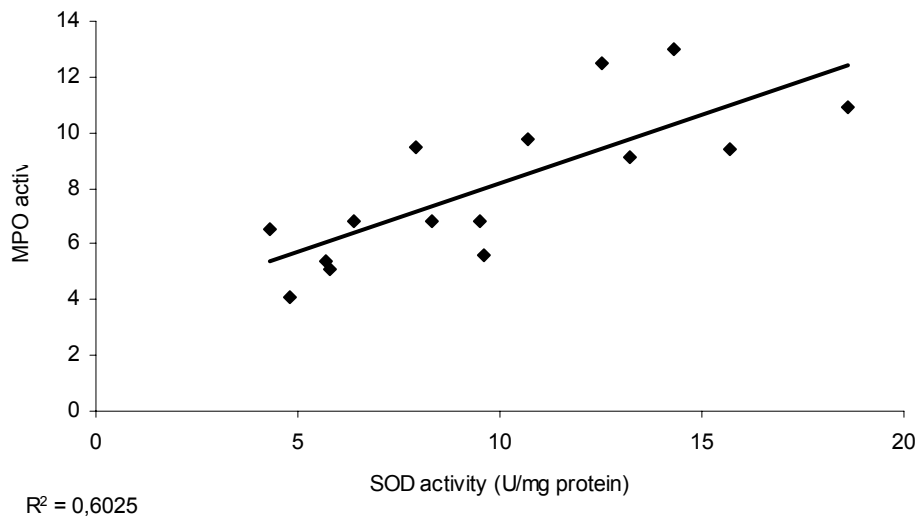


1 F: Correlation between early plasma SOD activity and oxidative damage to proteins in the Kidney

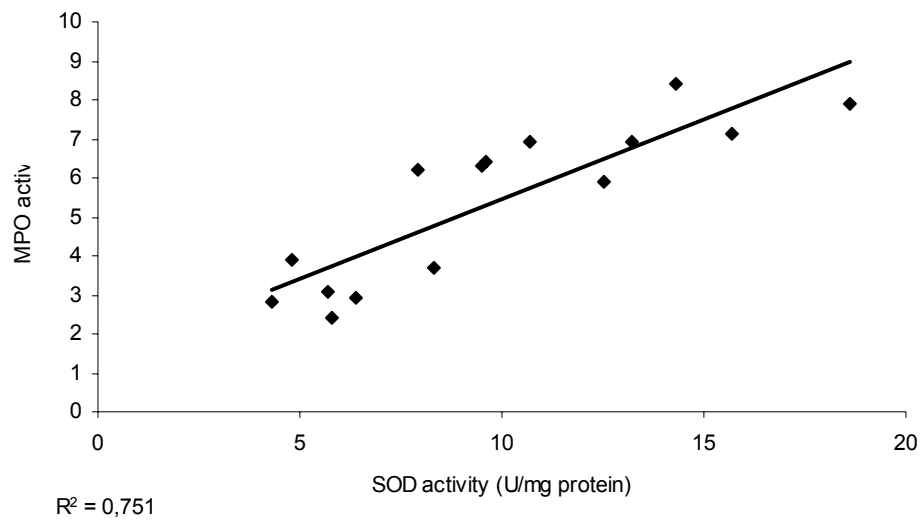
Figure 2 A – C: Correlation between early SOD activity and late myeloperoxidase activity in the liver, lung and kidney



2 A: Correlation between early plasma SOD activity and myeloperoxidase activity in the liver

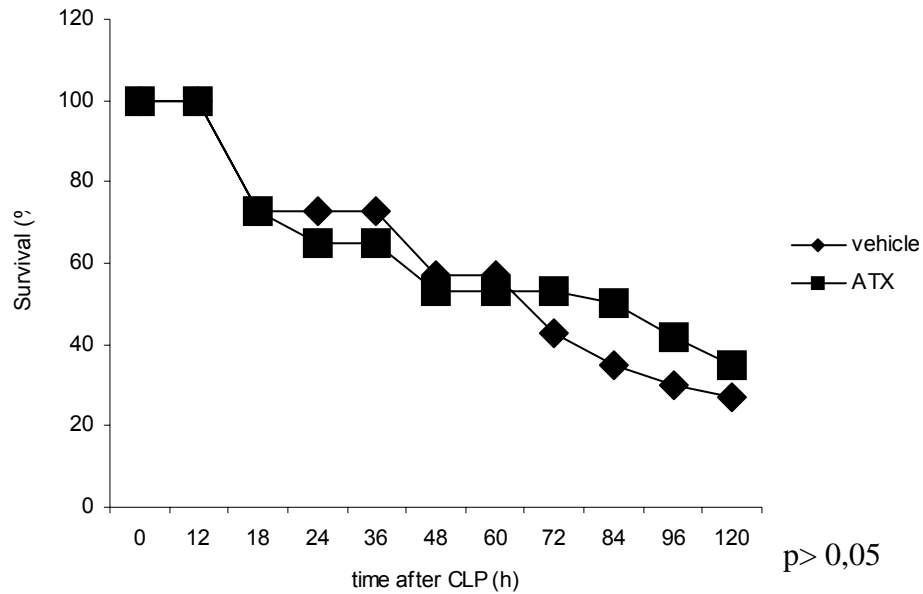


2 B: Correlation between early plasma SOD activity and myeloperoxidase activity in the lung

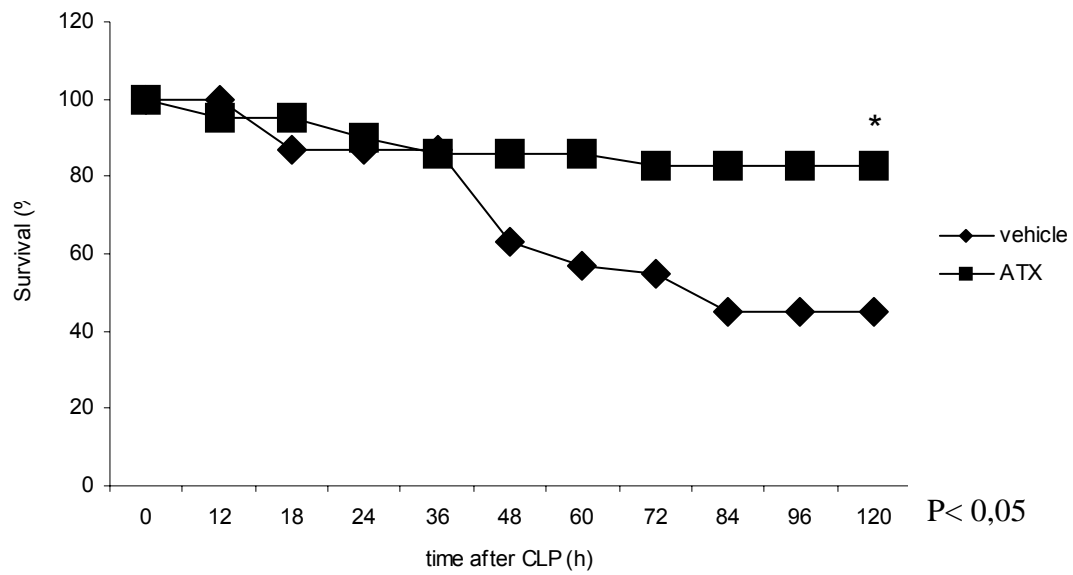


2 C: Correlation between early plasma SOD activity and myeloperoxidase activity in the kidney

Figure 3: Mortality rate when comparing basic support (vehicle) to basic support plus antioxidants (ATX) administered 3 hours after CLP according plasma SOD levels.

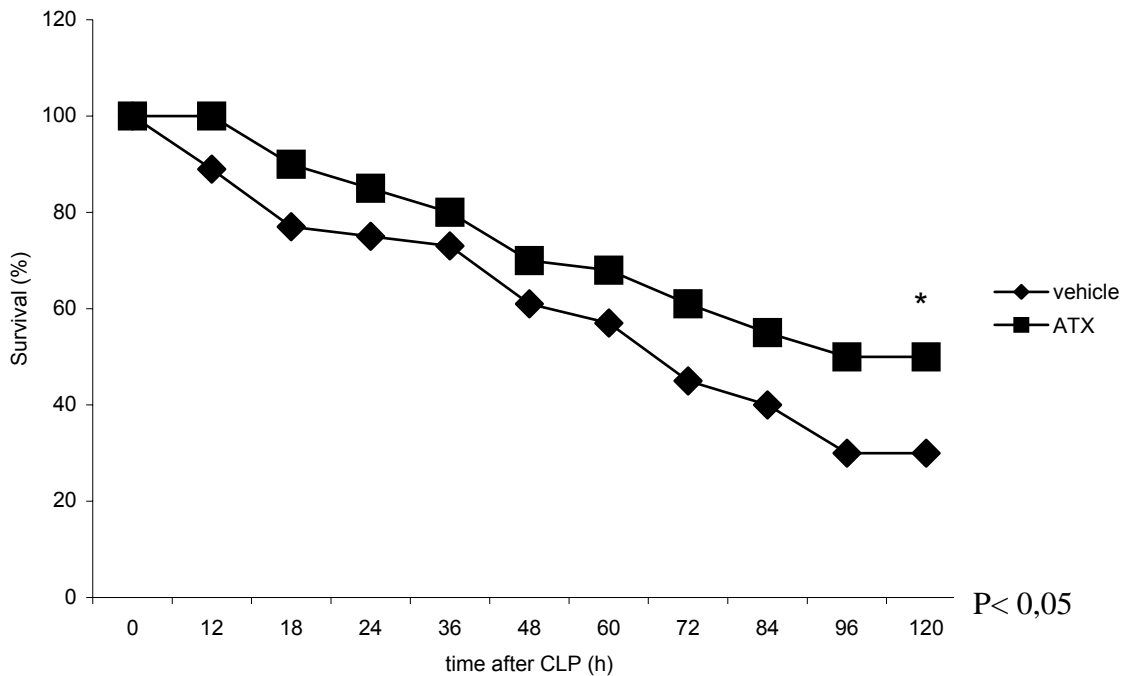


3 A: Mortality rate when comparing basic support to basic support plus antioxidants in animals with plasma SOD activity higher than 10 U/mg protein

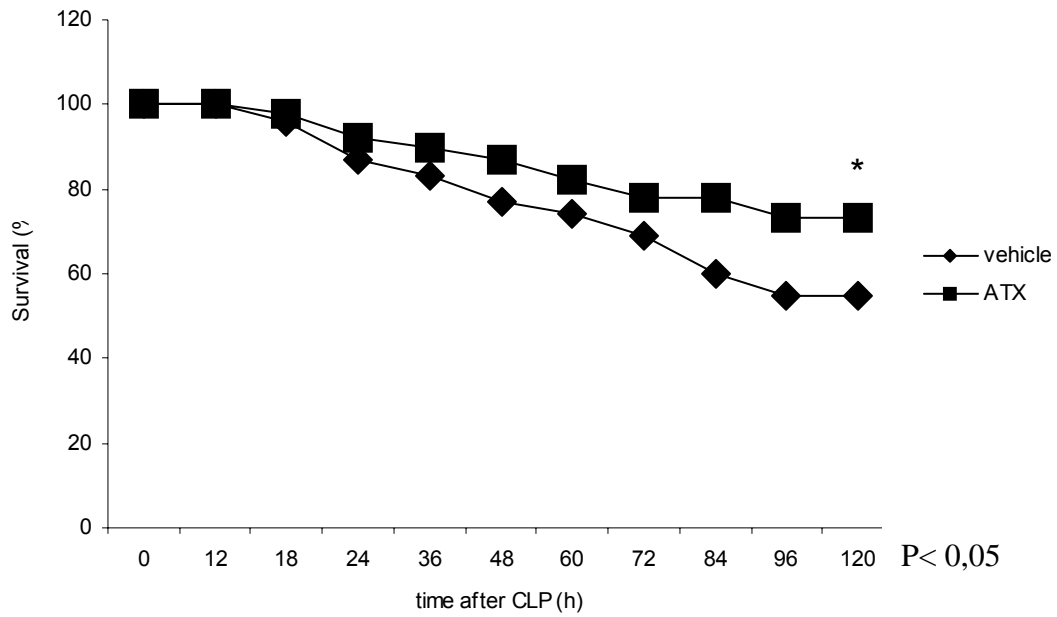


3 B: Mortality rate when comparing basic support plus antioxidants in the animals with plasma SOD activity lower than 10 U/mg protein

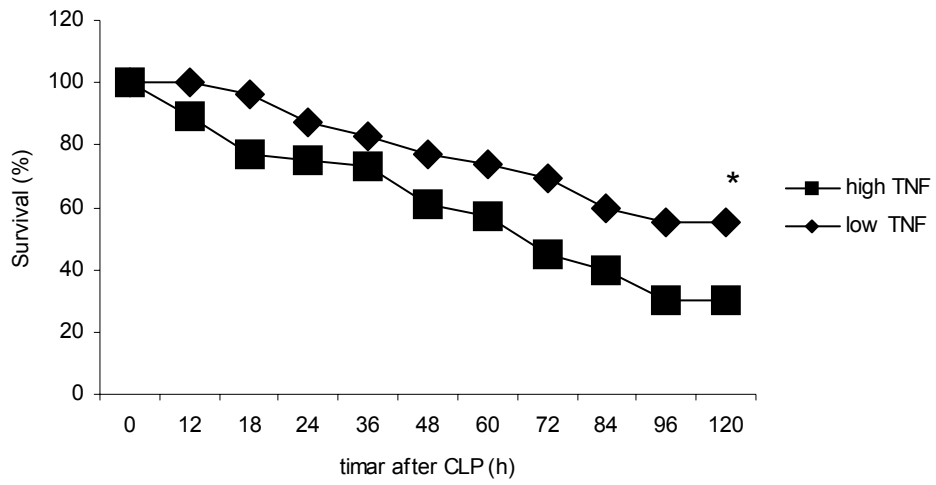
Figure 4: Mortality rate when comparing basic support (vehicle) to basic support plus antioxidants (ATX) administered 3 hours after CLP according plasma TNF α levels.



4 A: Mortality rate when comparing basic support to basic support plus antioxidants in the animals with TNF α higher than 1200pg/mg protein

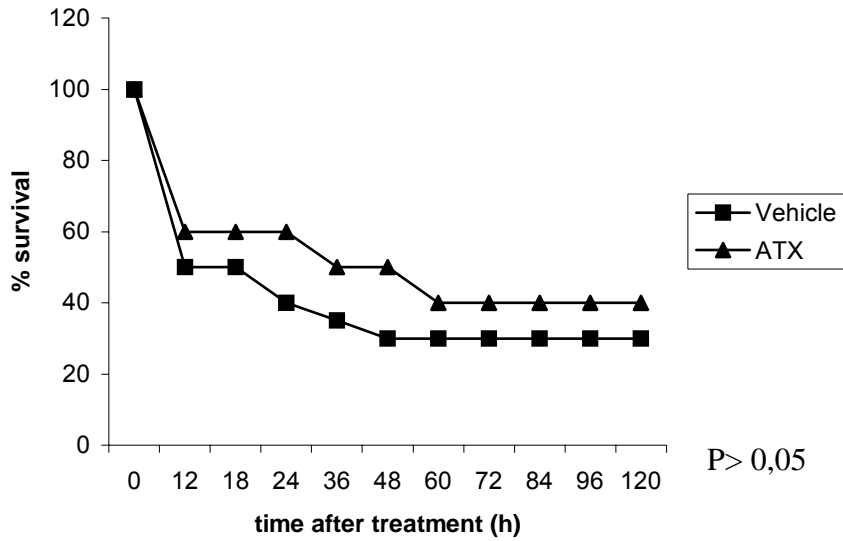


4 B: Mortality rate when comparing basic support to basic support plus antioxidants in the animals with TNF α lower than 1200pg/mg protein.

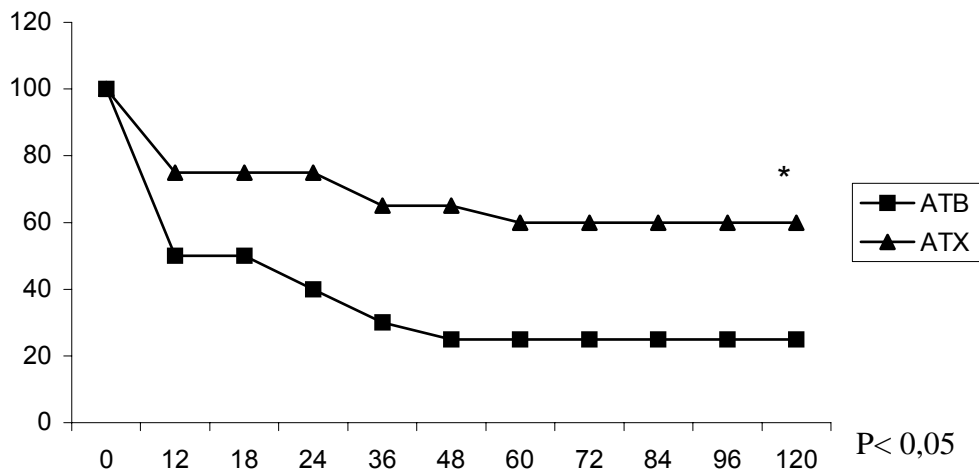


4C: Mortality prediction in the CLP model using early plasma TNF- α levels.

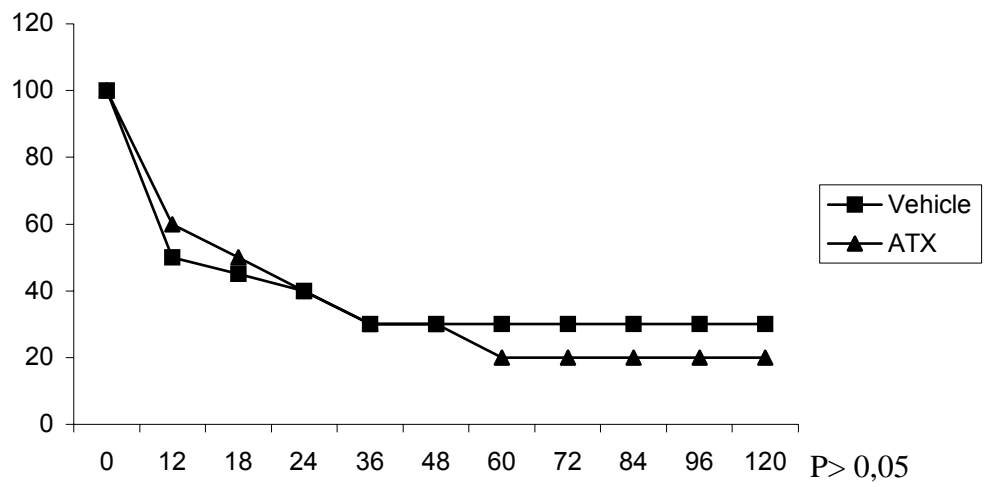
Figure 5: Mortality rate when comparing basic support (vehicle) to basic support plus antioxidants (ATX) administered 12 hours after CLP according to plasma SOD levels.



5 A: Mortality rate when comparing animals that received basic support (vehicle) and basic support plus antioxidants (ATX) after 12h of sepsis induction



5 B: Mortality rate when comparing animals with SOD lower than 10U/mg protein, that received basic support (vehicle) and basic support plus antioxidants (ATX) after 12h of sepsis induction.



5 C: Mortality rate when comparing animals with SOD higher than 10U/mg protein, that received basic support (vehicle) and basic support plus antioxidants (ATX) after 12h of sepsis induction.

Figure 6: ROC curve comparing sensitivity and specificity of APACHE II, MODS, SOD and Carbonyl with mortality

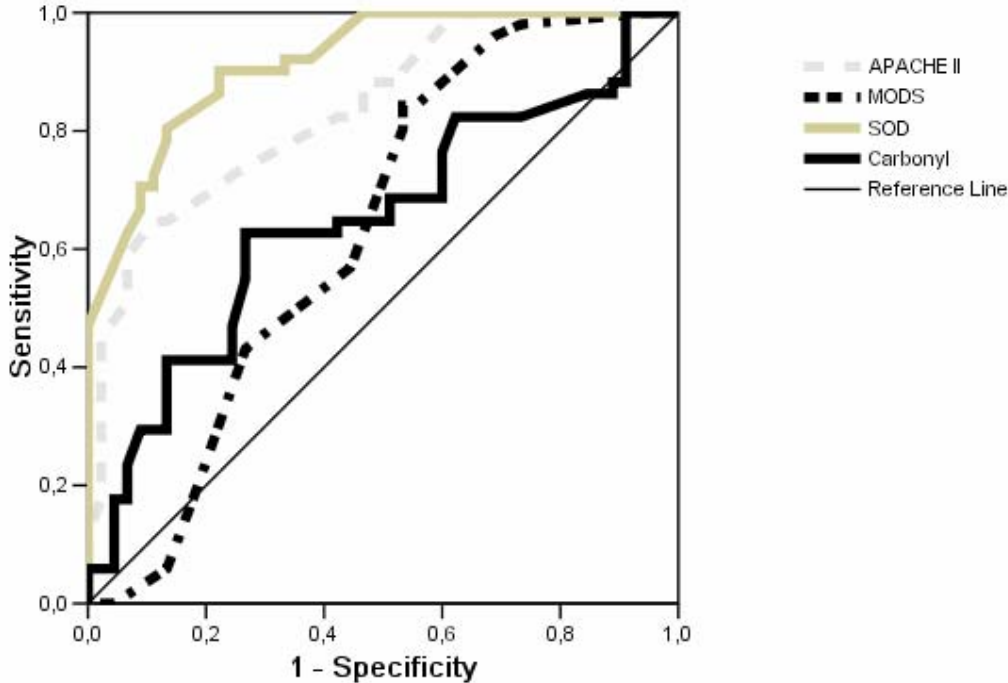


Figure 7: Correlation between plasma SOD activity and norepinephrine dose in septic patients.

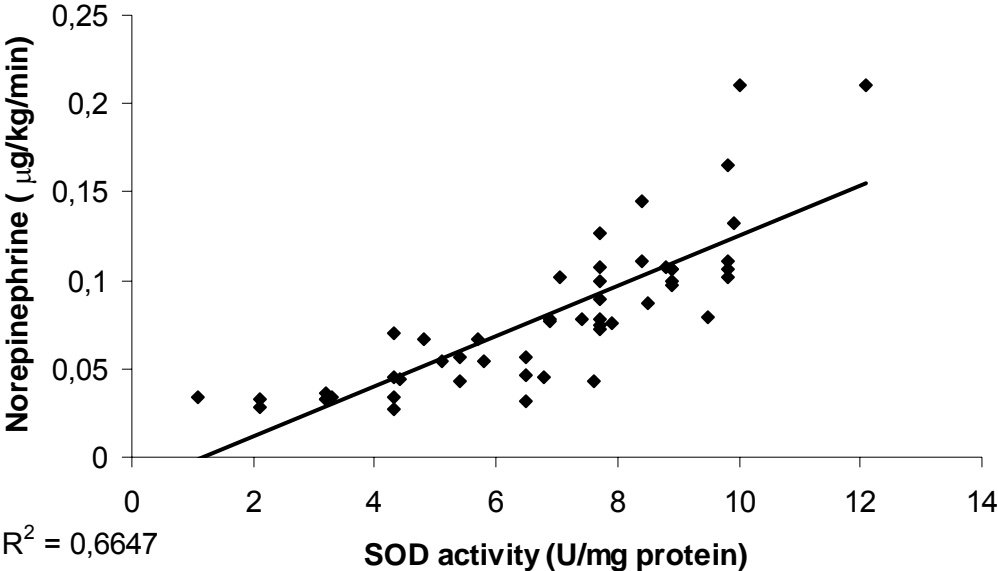


Table 1: Correlation between age, gravity scores and parameters of oxidative stress with ICU mortality

	<i>Survivor</i>	<i>Non-survivor</i>	<i>p</i>
Age	54,0 ± 14,4	58,7 ± 13,4	0,101
Sex			
Male	30	29	0.402
Female	15	22	
Sepsis severity			
Sepsis	21	0	
Severe sepsis	11	24	< 0.01
Septic shock	13	27	
APACHE II	16.2 ± 7.7	27.4 ± 7.7	< 0.01
MODS	8.6 ± 4.07	10.5 ± 2.48	< 0.01
SOD (U/mg protein)	3.96 ± 2.08	7.83 ± 1.68	< 0.01
Carbonyl (nmol/mg protein)	2.38 ± 1.69	3.49 ± 2.24	< 0.01
Catalase (U/mg protein)	3.14 ± 1.27	3.65 ± 1.36	0.06
TBARS (nmol/mg protein)	0.030 ± 0.022	0.032 ± 0.011	0.54

Table 2: Relation between plasma oxidative stress markers and vasoactive drug administration in septic patients.

	<i>Vasoactive drug</i>		<i>p</i>
	<i>Yes</i>	<i>No</i>	
<i>SOD (U/mg protein)</i>	6,97 ± 2.23	4.84 ± 2.77	<0.001
<i>CAT (U/mg protein)</i>	3.64 ± 1.35	3.11 ± 1.27	0.055
<i>TBARS (nmol/mg protein)</i>	0.30 ± 0.14	0.31 ± 0.20	0.862
<i>Carbonyl (nm/mg protein)</i>	3.59 ± 2.35	2.19 ± 1.29	0.001

References

1. Barriere SL, Lowry SF (1995). An overview of mortality risk prediction in sepsis. *Crit Care Med* 23: 376- 393.
2. Martin GS, Manino DM, Eathon S, Moss M (2003). The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348:1546-5.
3. Hoyert DL, Arias E, Smith BL, Murphy SL, Kochanek KD (1999). Deaths final data from 1999. *National vital statistics report CDC* 49: 8.
4. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR (2001). Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 29:1303–1310.
5. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulmé R, Lepage E, Le Gall J (2002). Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Int Care Med* 28: 108-121.
6. Annane D, Aegerter P, Jars-Guinestre MC, Guidet B (2002). Current Epidemiology of Septic Shock The CUB-Re´a Network. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 165–172.
7. Silva E, Pedro MA, Sogayar ACB (2004). Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care* 8: R251-R260.
8. Salvemini D, Cuzzocrea S (2002). Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med* 33:1173–1185.
9. Andrades M, Ritter C, Moreira JCF, Dal-Pizzol F (2005). Oxidative Parameters Differences during *Non-Lethal* and *Lethal* Sepsis Development. *J Surg Res* 125: 68–72.
10. Ritter C, Andrades M, Frota MLC, Bonatto F, Pinho RA, Polydoro M, Klamt F, Pinheiro CT, Menna-Barreto SS, Moreira JC, Dal-Pizzol F (2003). Oxidative

parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Int Care Med* 29:1782–1789.

11. Ettore Crimi, Vincenzo Sica, Sharon Williams-Ignarro, Haibo Zhang, Arthur S. Slutsky, Louis J. Ignarro, Claudio Napoli (2006). The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Rad Biol Med* 40: 398 – 406.
12. Eichacker PQ, Parent C, Kalil A, Esposito C, Cui X, Banks SM, Gerstenberger EP, Fitz Y, Danner RL, Natanson C (2002). Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 166(9):1197-1205.
13. Remick DG, Bolgos GE, Siddiqui J (2003). Inflammatory status in sepsis alters efficacy of interleukin-18 binding protein therapy. *Crit Care Med* 31:2096–2101.
14. Warner A, Bencosme A, Healy D, Verme C (1995). Prognostic role of antioxidant enzymes in sepsis: preliminary assessment. *Clin Chem* 41: 867-71.
15. Motoyama T, Okamoto K, Kukita I, Hamaguchi M, Kinoshita Y, Ogawa H (2003) Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 31:1048 –1052.
16. Winterbourn CC, Buss IH, Chan TP, Plank LD, Clark MA, Windsor JA (2000). Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Crit Care Med* 28(1):143-9.
17. Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Webster NR (1995) Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med* 23(4):646-51.
18. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH (1980) Sepsis and septic shock—A review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 29:189–199.

19. Ritter C, Andrades M, Reinke A, Menna-Barreto SS, Moreira JCF, Dal-Pizzol F (2004). Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves mortality in sepsis. *Crit Care Med* 32: 342.
20. American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee (1992). Definitions of sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 101: 1644-1655.
21. Draper HH, Hadley M (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186:421–431.
22. Levine R L, Garland D, Oliver CN (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186: 464.
23. Liaudet L, Mabley JG, Soriano FG (2001) Inosine reduces systemic inflammation and improves survival in septic shock induced by cecal ligation and puncture. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1213–122.
24. Aebi H (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121.
25. Bannister JV, Calabrese L (1987). Assays for SOD. *Methods Biochem Anal* 32: 279.
26. Abraham E (1999). Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis. *Intensive Care Med* 25:556–566.
27. Veja AJM, Diaz J, Serrano E, Carbonell LF (2002). Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 30(8):1782-1786.
28. Fattman CF, Schaefer LM, Oury TD (2003). Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med* 35(3):236-256.
29. Gielen S, Schuler G, Hambrecht R (2001). Exercise training in coronary artery disease and coronary vasomotion. *Circulation* 103: pp. E1–E6.

- 30.** Luoma JS, Stralin P, Marklund SL, Hiltunen TP, Sarkioja T, Herttuala SY (1998). Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions colocalization with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 18: 157–167.
- 31.** Carlsson LM, Jonsson J, Edlund T, Marklund SL (1995). Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6264–6268.
- 32.** Folz RJ, Abushamaa AM, Suliman HB (1999). Extracellular superoxide dismutase in the airways of transgenic mice reduces inflammation and attenuates lung toxicity following hyperoxia, *J. Clin. Invest* 103: 1055–1066.
- 33.** McCord JM, Gao B, Leff J, Flores SC (1994). Neutrophil-generated free radicals possible mechanisms of injury in adult respiratory distress syndrome. *Environ. Health Perspect* 102: S10: 57–60.

Superóxido dismutase plasmática prediz resposta ao tratamento com antioxidante em um modelo animal de sepse

OBJETIVOS: determinar a relação entre parâmetros de estresse oxidativo, severidade de sepse e resposta ao tratamento com antioxidantes.

MATERIAL E MÉTODOS: foram incluídos pacientes consecutivos admitidos na UTI de um hospital terciário com o diagnóstico de sepse, sepse grave ou choque séptico. Os pacientes foram avaliados diariamente e foi coletado sangue imediatamente após a inclusão no estudo (máximo de 12h após diagnóstico de sepse). Avaliou-se os níveis séricos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), carbonilação de proteínas, atividade de superóxido dismutase (SOD) e catalase. Estas variáveis foram correlacionadas com desfecho e variáveis clínicas. Para determinar a relação dos parâmetros oxidativos na resposta ao tratamento, utilizamos o modelo de ligação cecal e perfuração (CLP) empregando ou não tratamento antioxidante (N-acetilcisteína mais deferoxamina) três ou doze horas após a indução de sepse.

RESULTADOS: níveis elevados de proteínas carboniladas e de SOD no diagnóstico de sepse são relacionados com óbito por sepse nesta amostra. Estes parâmetros são correlacionados com a gravidade da doença avaliada pelos escores APACHE II e MODS. Níveis de atividade da SOD podem prever resposta ao tratamento com antioxidantes no modelo CLP, tanto 3 como 12 horas após a indução de sepse.

CONCLUSÃO: Parâmetros oxidativos são associados com gravidade e desfecho de sepse em uma UTI geral, e podem prever resposta ao tratamento antioxidante em modelo animal.

Sepse e as conseqüências da resposta a sepsé são as principais causas de mortalidade em unidades de terapia intensiva¹. A incidência de sepsé aumentou de 82,7 casos para 100000 pessoas em 1979 para 240,4 casos por 100000 pessoas em 2000². A mortalidade geral oscila entre 28 e 60% dependendo da gravidade da sepsé^{3,4,5,6,7}.

Muitos mecanismos moleculares de inflamação e dano celular tem sido implicados na patogênese da sepsé, incluindo aqueles relacionados à produção exagerada de citocinas, eicosanoides e espécies ativas de oxigênio (EAO)⁸. Acredita-se que as EAO sejam importantes mediadores, contribuindo para o desenvolvimento e mortalidade da sepsé^{9,10}, mas até o momento não existe nenhum resultado convincente de ensaios clínicos utilizando antioxidantes como terapia adjuvante no tratamento da sepsé¹¹.

Tendo em vista que a resposta séptica é heterogênea e depende das características do hospedeiro e do patógeno, é razoável supor-se que alguns subgrupos de pacientes vão responder melhor do que outros a um tratamento individual, e isto foi observado em estudos clínicos¹². Deste modo, em um estudo recentemente publicado, Dr Remick et al determinaram em modelo animal de sepsé, que o tratamento com proteína ligadora de IL-18 foi eficaz somente no subgrupo de animais com elevados níveis plasmáticos de IL-6¹³. Nós demonstramos que alguns parâmetros oxidativos, principalmente superóxido dismutase (SOD), poderiam ser um marcador de mortalidade em um modelo animal de sepsé¹⁰, e que esta enzima poderia ser uma fonte geradora de radicais livres durante o desenvolvimento da sepsé⁹. Além disso, muitos estudos em humanos determinaram o valor dos parâmetros oxidativos plasmáticos como marcadores prognósticos em pacientes sépticos^{14,15,16,17}. Até o momento nenhum estudo foi realizado para determinar subgrupos de indivíduos que respondam ou não a terapia antioxidante. Deste modo, o objetivo deste estudo foi determinar, em um modelo animal de sepsé, se parâmetros plasmáticos, oxidativos ou inflamatórios, poderiam prever resposta a

tratamento antioxidante, e se estes parâmetros poderiam prever mortalidade por sepse em humanos.

Material e Métodos

Todos os procedimentos neste estudo foram realizados de acordo com os Guidelines do National Institutes of Health e com a aprovação da comissão de ética local. Todos os pacientes ou seus familiares assinaram o consentimento informado antes da inclusão no estudo.

Parte 1 – Modelo animal de sepse

Ratos Wistar machos com 2–3 meses, submetidos a ligação e perfuração cecal (CLP) conforme previamente descrito¹⁸, foram utilizados neste estudo. Os ratos eram anestesiados com uma mistura de Ketamina (80mg/kg) e Xylazine (10mg/kg), intraperitoneal. Sob condições assépticas, uma laparotomia de 3.0cm era realizada para permitir exposição do ceco com intestino adjacente. O ceco era firmemente ligado, com um fio de sutura seda 3-0 na sua base, abaixo da válvula ileocecal, e perfurado uma vez com uma agulha 14 gauge. O ceco era então gentilmente espremido para eliminar uma pequena quantidade de fezes pelo sítio da perfuração. O ceco era então devolvido a cavidade peritoneal e a laparotomia fechada com fio de sutura seda 4-0. Os animais eram ressuscitados com solução fisiológica normal (50ml/kg subcutâneo) imediatamente após e 12h após a CLP. Todos os animais eram devolvidos às suas gaiolas com livre acesso a comida e água.

Protocolo Experimental

Já que nós demonstramos previamente que atividade plasmática precoce de SOD poderia prever mortalidade em modelo de CLP^{9,10}, neste momento, nós determinamos a

correlação entre atividade plasmática precoce de SOD com dano oxidativo tardio e infiltração neutrofílica nos pulmões, rins e fígado (descrito subsequente).

Neste experimento, 30 ratos foram tornados sépticos pela técnica de CLP, 15 animais realizaram apenas laparotomia e 15 animais foram submetidos a CLP com ressuscitação volêmica (solução salina 50ml/kg imediatamente após e 12h após CLP). Três horas após CLP era colhido sangue da veia caudal para determinação da atividade de superóxido dismutase. Vinte e quatro horas mais tarde, os ratos foram mortos por decapitação seguindo-se por coleta de amostras dos pulmões, fígado e rins, as quais foram imediatamente estocadas a -70° C até determinação da atividade de mieloperoxidase, formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, e proteínas carboniladas.

Experimento de sobrevida

Para determinar se atividade plasmática precoce de SOD pode predizer resposta em sobrevida ao tratamento com antioxidante (o protocolo foi descrito em detalhes pelo nosso grupo na referência 19)¹⁹, foi testada em separado uma coorte de animais. Em um primeiro protocolo, os animais expostos a CLP, foram randomizados para receber: Grupo 1 laparotomia branca; Grupo 2: submetidos a CLP com “suporte básico” (solução salina 50ml/kg imediatamente e 12h após CLP mais ceftriaxone 30mg/kg e clindamicina 25mg/kg a cada 6h, iniciando 3 horas após a indução de sepse; Grupo 3: o mesmo protocolo do grupo 2 mais N-acetilcisteína (NAC) (20mg/kg) 3h, 6h e 12h após CLP mais Deferoxamina (DFX) (20mg/kg) iniciando 3h após CLP com injeções subcutâneas. Neste experimento, três horas após CLP, o sangue era coletado da veia caudal para determinação da atividade da SOD e concentração de TNF α .

Em um segundo grupo de experimentos, nós investigamos se o tratamento com antioxidante poderia ser retardado para 12 horas após a indução de sepse utilizando

atividade precoce de SOD para prever resposta ao tratamento. Os animais foram submetidos a CLP e divididos em 3 grupos: Grupo 1: laparotomia branca; Grupo 2: submetidos a CLP mais “suporte básico” (solução salina 50ml/kg imediatamente e 12h após CLP, mais ceftriaxone 30mg/kg e clindamicina 25mg/kg a cada 6h, iniciando 12 horas após a indução de sepse; Grupo 3: o mesmo protocolo do grupo 2 mais N-acetilcisteína (NAC) (20mg/kg) 3h, 6h e 12h, iniciando 12h após CLP mais Deferoxamina (DFX) (20mg/kg) iniciando 12h após CLP com injeções subcutâneas. Neste experimento doze horas após CLP era coletado sangue da veia caudal para determinação da atividade de SOD. Neste experimento a taxa de mortalidade foi registrada por um período de 5 dias.

Parte 2 – Estudo em Humanos

Para determinar se parâmetros oxidativos plasmáticos que poderiam prever desfecho em modelo de CLP poderiam também prever desfecho em humanos com sepse nós realizamos um estudo prospectivo observacional em uma unidade de Terapia Intensiva de um Hospital Universitário. 96 pacientes criticamente doentes admitidos em um período de 12 meses na Unidade de Terapia Intensiva de um Hospital Universitário de cuidados terciários foram incluídos neste estudo. Os pacientes foram divididos em grupos de acordo com o diagnóstico de sepse (n=21), sepse grave (n=35) ou choque séptico (n=40), de acordo com os critérios da Conferência de Consenso de Sepse²⁰, por dois intensivistas cegos ao estudo. No momento do diagnóstico, amostras de sangue heparinizadas foram coletadas e colocadas imediatamente no gelo e estocadas a -80°C para determinação de parâmetros de dano oxidativo (ver abaixo). Em paralelo a coleta de amostra para análise de marcadores plasmáticos, dados clínicos relevantes foram registrados diariamente até a alta da UTI. Os critérios de exclusão foram: idade menor do que 18 anos, insuficiência renal ou hepática crônicas, neoplasia recebendo quimio ou

radioterapia, imunodeficiência. O manejo dos pacientes seguiu o protocolo padrão da Instituição, sem a interferência dos investigadores.

Medidas

Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS): Como índice de estresse oxidativo nós utilizamos a formação de TBARS durante uma reação ácida aquecida conforme previamente descrito²¹. Rapidamente, as amostras eram misturadas com 1ml de ácido tricloroacético 10% e 1ml de ácido tiobarbitúrico 0,67% e então aquecidas em água fervente por 15 minutos. TBARS era determinado pela absorbância a 535nm usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Para minimizar peroxidação durante o procedimento, hidroxitolueno butilado era adicionado a mistura. Os resultados eram expressos em equivalentes de malonaldeído por miligrama de proteína (método de Lowry).

Proteínas Carboniladas: O dano oxidativo a proteínas foi encontrado pela determinação dos grupos carbonil baseado na reação com dinitrofenilidrazina conforme previamente descrito²². Brevemente, as proteínas eram precipitadas pela adição de ácido tricloroacético a 20% e redissolvidas em dinitrofenilidrazina, e a absorbância era lida a 370nm.

Ensaio de atividade de mieloperoxidase Como índice de infiltração neutrofílica, nós medimos atividade de mieloperoxidase (MPO) em homogenato de tecidos. Tecidos foram homogenizados (50mg/ml) em brometo de hexadeciltrimetilamonio 0,5% em 10mM de ácido 3-N-morfolnopropanosulfônico e centrifugados a 15000 $\times g$ por 40 minutos. A suspensão era então sonicada três vezes por 30 segundos. Uma alíquota do sobrenadante era misturada com uma solução de 1.6mM de tetrametilbenzidina e 1mM de peróxido de hidrogênio. Atividade era medida espectrofotometricamente como a mudança na absorbância de 650nm a 37°C, utilizando um leitor de microplacas²³. Resultados foram

expressos como miliunidades de MPO por milligrama de proteína, o qual era determinado pelo ensaio de Bradford.

Medida de concentração plasmática de Superóxido dismutase (SOD) e atividade de Catalase (CAT): Atividade de Catalase (CAT) foi medida pela taxa de decaimento na absorvância de peróxido de hidrogênio a 240 nm e expressa como U/mg de proteína, como descrito anteriormente²⁴. Atividade de Superóxido dismutase (SOD) foi acessada através da medida da inibição da auto-oxidação de adrenalina conforme previamente descrito²⁵.

Medidas das Concentrações Plasmáticas de TNF α : kits ELISA comerciais foram utilizados para a detecção de TNF- α (Quantikine, R&D Systems Europe Ltda, Abingdon, UK).

Reagentes

Ácido tiobarbitúrico, CAT, SOD, dinitrofenilhidrazina, adrenalina, foram comprados de Sigma Chemical (St. Louis, MO). NAC foi comprada de Zambon Laboratórios Farmacêuticos (Brasil). DFX foi comprada de Novartis (Brasil).

Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão para variáveis com distribuição normal. Para medidas repetidas uma análise bifatorial de variância foi realizada. Comparações entre médias foram conduzidas utilizando o teste de Newman-Keuls. Análise multivariada foi realizada para controlar potenciais fatores de confusão. Os resultados são relatados como médias não ajustadas. Teste de correlação de Pearson foi utilizado para associações de estudo entre níveis e outras variáveis. Diferenças com valor de p menores do que 0,05 foram consideradas significantes.

Resultados

Nós demonstramos que após CLP, mas não em animais com laparotomia branca, (dados não mostrados), atividade plasmática precoce de SOD (coletada 3 horas após CLP) positivamente se correlacionou com dano oxidativo tardio (determinado 24 horas após CLP) nos pulmões, fígado e rins (Figura 1 A-F). Além disso, atividade de SOD plasmática se correlacionou com atividade de mieloperoxidase nos pulmões, e rins, mas não no fígado (Figura 2 A-C). Considerando que atividade plasmática de SOD parece se correlacionar com dano oxidativo tardio e resposta inflamatória, e que nós previamente demonstramos que atividade plasmática de SOD poderia prever mortalidade no modelo CLP, nós tentamos determinar se atividade plasmática de SOD poderia prever resposta ao tratamento no modelo CLP. Portanto para determinar se atividade plasmática de SOD poderia prever resposta ao tratamento no modelo CLP, nós dividimos os animais de acordo com o tratamento em 2 grupos: 1. SOD > 10 U/mg proteína 2. SOD < 10 U/mg proteína (estes valores foram determinados analisando curvas ROC). Não houve diferença na mortalidade, quando comparamos suporte básico com suporte básico mais antioxidantes, nos animais com atividade plasmática de SOD maior do que 10 U/mg de proteína (Figura 3A). Ao contrário, os animais com atividade plasmática de SOD menor do que 10 U/mg de proteína, que receberam antioxidantes, apresentaram maior sobrevivência quando comparados a animais que receberam apenas suporte básico (Figura 3B). Nós testamos quando TNF α precoce poderia prever resposta ao tratamento antioxidante, mas falhamos em detectar tal associação. Independentemente dos níveis plasmáticos de TNF α (maiores ou menores do que 1200 pg/mg de proteína), animais que receberam antioxidantes apresentaram maiores taxas de sobrevivência quando comparados com suporte básico isolado, (Figura 4A e figura 4B). Portanto, uma vez que estes valores de corte de TNF α , pode prever desfecho neste modelo (Figura 4C) nós supomos que a capacidade da atividade plasmática de SOD em prever resposta a tratamento com antioxidantes não

foi somente relacionada a severidade da doença. Quando antioxidantes são administrados 12h após CLP, a mortalidade não foi significativamente diferente dos animais que utilizaram suporte básico (Figura 5A). No subgrupo de animais com SOD plasmática menor do que 10U/mg de proteína, mas não no subgrupo com atividade plasmática maior do que 10UI/mg de proteína, o tratamento antioxidante foi superior ao uso isolado de suporte básico (Figuras 5B e 5C).

Para determinar se atividade plasmática de SOD poderia ter valor prognóstico em sepse em humanos, nós realizamos um estudo observacional em humanos como descrito na seção de material e métodos. A população compreendeu 96 pacientes: 45 sobreviventes e 51 não sobreviventes, 21 tinham sepse, 35 sepse grave e 40 choque séptico, na apresentação no estudo. Parâmetros epidemiológicos e de dano oxidativo são apresentados na tabela 1. Como esperado, escores clínicos (APACHE II e MODS) de gravidade de doença, puderam prever desfecho em nossa amostra.(Tabela 1). Além disso, Carbonil plasmática e atividade de SOD, mas não TBARS plasmático e atividade de Catalase, foram significativamente maiores em não-sobreviventes quando comparados a sobreviventes. Níveis plasmáticos de Carbonil apresentaram significante, mas fraca correlação com APACHE II ($p=0.005$, $r=0.282$) e MODS ($p=0.04$, $r=0.211$), mas não se correlacionaram com atividade de SOD. Atividade de SOD significativamente se correlacionou com APACHE II ($p<0.001$, $r=0.573$) e MODS ($p<0.001$, $r=0.457$). Além disso, atividade de SOD apresentou uma elevada área sob a curva ROC (0.917) quando comparada com APACHE II (0.838), MODS (0.631) e carbonil (0.648). Utilizando um ponto de corte de 5.5U/mg de proteína, atividade plasmática de SOD pode prever desfecho com uma sensibilidade de 90% e especificidade de 80%. Uma vez que a SOD extracelular (EC-SOD) pode estar relacionada com o controle do tônus vascular nós determinamos a correlação entre parâmetros de estresse oxidativo e a necessidade de vasopressores. Os níveis proteínas carboniladas e atividade de SOD foram

significativamente maiores em pacientes que usaram vasopressor em comparação com os que não usaram (Tabela 2). Entretanto, apenas a atividade da SOD (Figura 7), mas não as proteínas carboniladas (dados não mostrados), se correlaciona significativamente com a maior dose utilizada de norepinefrina.

Discussão

Pacientes com sepse representam um grupo heterogêneo de indivíduos. Dentro desta população de pacientes estão indivíduos que desenvolvem uma excessiva resposta inflamatória ao desafio séptico, e vão morrer, enquanto outros têm uma apropriada resposta inflamatória e vão sobreviver. O modelo CLP pode ser utilizado para explorar estas diferenças individuais e pode ser utilizado para testar a potencial utilidade de imunoterapias recentemente descritas. A hipótese básica é que alguns hospedeiros têm uma resposta apropriada a sepse que não deve ser alterada, enquanto outros hospedeiros têm uma resposta inapropriada que necessita ser modificada para melhorar o desfecho. Nós previamente demonstramos que atividade de SOD foi o mais precoce parâmetro oxidativo para prever desfecho em ratos^{9,10}. Aqui nós demonstramos que atividade precoce de SOD se correlacionou com dano oxidativo tardio. Além disso, nossos dados mostram que a administração precoce ou tardia de antioxidantes melhorou a sobrevivência naqueles ratos com baixa atividade plasmática de SOD, sugerindo que antioxidantes foram mais efetivos, em animais com sepse menos grave. Em contraste, quando dividimos os animais usando níveis plasmáticos de TNF α , nós não pudemos demonstrar um subgrupo que responda diferentemente a terapia antioxidante. Isto sugere que a habilidade da SOD em prever resposta ao tratamento antioxidante não foi relacionada somente com a gravidade de sepse. Estudos clínicos de grande escala, utilizando imunomoduladores não conseguiram melhorar a taxa de mortalidade (revisado na referência 26)²⁶. Nossos resultados provem uma potencial explicação para estas falhas

nos estudos clínicos, aja visto que todos os pacientes receberam a mesma imunoterapia, a despeito de seu estado. Isto também foi verdade para a proteína ligadora da IL-18, em um elegante estudo Remick et al demonstraram em um modelo de CLP de sepse em roedores que a resposta a este tratamento dependia do estado imune do animal¹³. É possível que resultados similares pudessem ter sido obtidos com outras terapias imunomoduladoras tais como a inibição do TNF. Especificamente, sobrevida geral talvez não possa ser melhorada, mas subgrupos específicos podem se beneficiar.

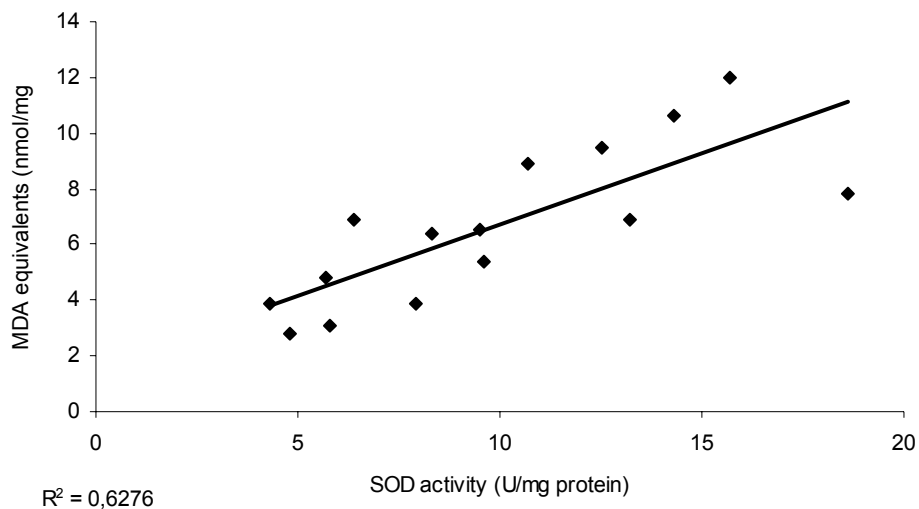
Os resultados dos modelos de CLP foram reforçados pelos achados de que atividade plasmática de SOD parece ser superior, quando comparada com outros marcadores de dano oxidativo e escores clínicos de gravidade, para prever desfecho em sepse em humanos. Nós só encontramos um artigo publicado que demonstrou o papel da atividade plasmática da SOD no prognóstico de pacientes sépticos¹⁴. Estes autores demonstraram que a atividade da SOD plasmática foi superior a atividade da Catalase em prever desfechos em humanos com sepse. Em nosso estudo, catalase e TBARS não se correlacionaram com escores de gravidade, diferentemente de alguns dados publicados previamente¹⁵. Alguns poucos estudos compararam diferentes parâmetros oxidativos e sua relação com gravidade e desfecho na sepse. Winterbourn et al demonstraram que carbonil foi um melhor marcador de severidade de doença, quando comparada com TBARS¹⁶. Goode et al demonstraram uma diminuição do estado antioxidante e um aumento da peroxidação lipídica em pacientes com choque séptico, mas não apresentaram uma comparação direta entre estes marcadores¹⁷. Além disso, pacientes admitidos em Unidades de Terapia Intensiva com critérios de síndrome de resposta inflamatória sistêmica tem estresse oxidativo mais severo do que pacientes sem esta síndrome, mas novamente, este estudo não comparou diferentes marcadores oxidativos²⁷. Portanto, nossos dados provem algumas informações novas no uso de

marcadores de estresse oxidativo, principalmente na atividade plasmática de SOD, como um biomarcador importante em sepse em humanos.

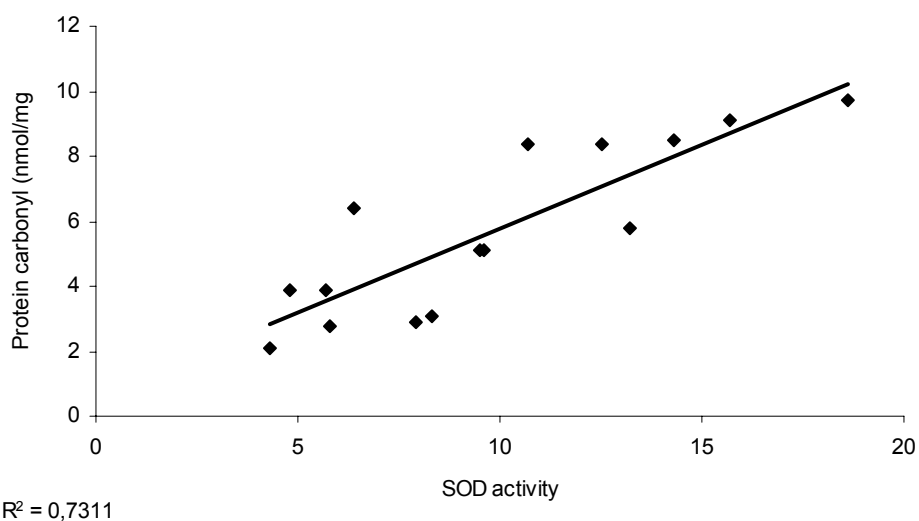
A significância fisiopatológica da observada atividade plasmática elevada, sua relação com a gravidade de sepse e predição de resposta ao tratamento foi incerta. Um importante papel para as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na patogênese da injúria da isquemia-reperfusão tem sido demonstrado em inúmeros estudos. O preciso mecanismo pelo qual SOD extracelular (EC-SOD) protege contra injúria de isquemia-reperfusão ainda não foi bem estabelecido. A maioria das teorias atual sustenta a idéia de que pela retirada de superóxido, EC-SOD protege a bioatividade do óxido nítrico (ON)²⁸. Muitos estudos recentes têm sugerido que, a regulação da produção de ON e, a expressão de EC-SOD, podem estar firmemente associados (revisado em referência 30)³⁰. Por exemplo, achados de um estudo mostraram a elevação simultânea de ambos iNOS e EC-SOD em lesões ateroscleróticas em humanos e coelhos³⁰. O papel da EC-SOD na patogênese da lesão pulmonar aguda tem sido investigado em modelos de camundongos expressando níveis alterados de EC-SOD. Camundongos nulos para EC-SOD eram fenotipicamente normais, até que fossem estressados³¹. Entretanto, exposição de camundongos livres de EC-SOD a >99% de oxigênio causou significativa redução na viabilidade e no aparecimento precoce de edema pulmonar severo quando comparado com o tipo selvagem de camundongo. Isto sugere que, sobre condições normais, os animais são capazes de compensar a ausência de EC-SOD, mas, quando expostos a estresse oxidativo, os camundongos não conseguiram compensá-la e mostraram sensibilidade aumentada³¹. Além disso, o camundongo transgênico EC-SOD apresentou significativamente menos neutrófilos nos pulmões após exposição a hiperóxia, sugerindo que a presença de EC-SOD pode atenuar a inflamação aguda associada com injúria pulmonar por hiperóxia³². Degranulação neutrofílica durante a progressão de Síndrome da disfunção respiratória aguda (ARDS) libera uma variedade de enzimas proteolíticas para o

espaço extracelular. Um estudo recente de McCord et al encontrou que neutrófilos ativados são capazes de causar proteólise parcial de EC-SOD de coelho in vitro, resultando em redução da afinidade de EC-SOD pela superfície endotelial. Isto sugere que afinidade reduzida de EC-SOD pela heparina em ARDS pode resultar em uma perda da proteção antioxidante e exacerbação desta condição. Isto é sustentado pelo fato de que EC-SOD plasmática está elevada em pacientes com ARDS³³. Além disso, nós demonstramos previamente que um aumento na atividade da SOD pode contribuir para dano oxidativo em muitos órgãos após indução de sepse em modelo de CLP¹⁹. Então nós sugerimos que atividade de SOD não foi somente um marcador de gravidade, já que TNF α não pode prever resposta antioxidante no modelo CLP, mas pode refletir alterações no balanço oxidante/antioxidante, o que não foi tratado no presente estudo.

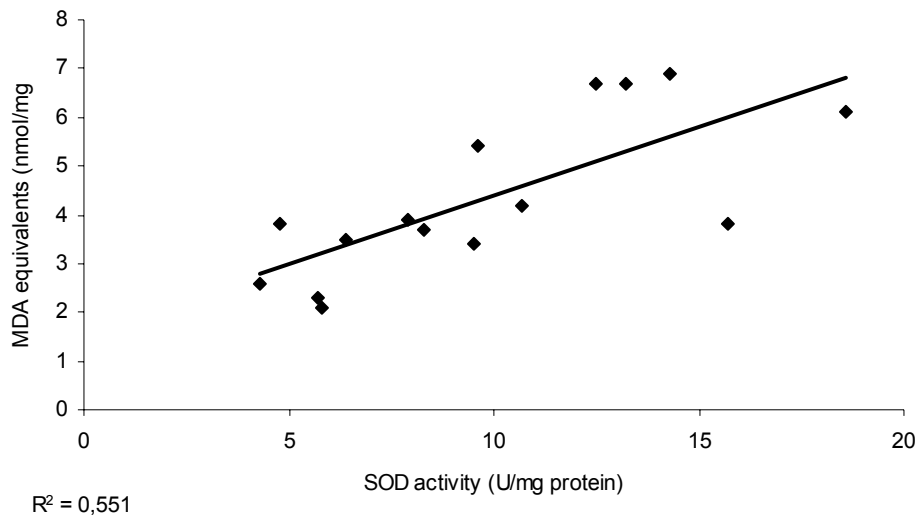
Figura 1 A-F: **Correlação de atividade plasmática de SOD com dano oxidativo nos pulmões, fígado e rins**



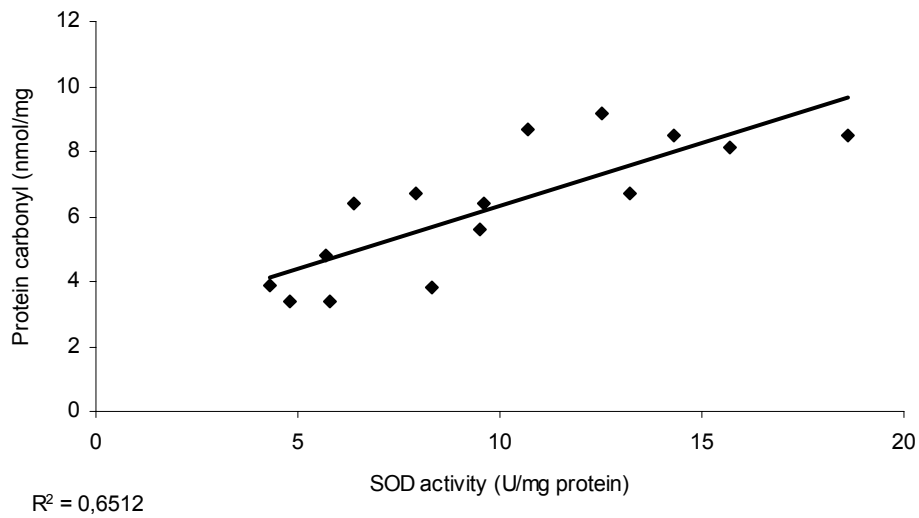
1 A: Atividade plasmática precoce de SOD e peroxidação lipídica tardia no fígado



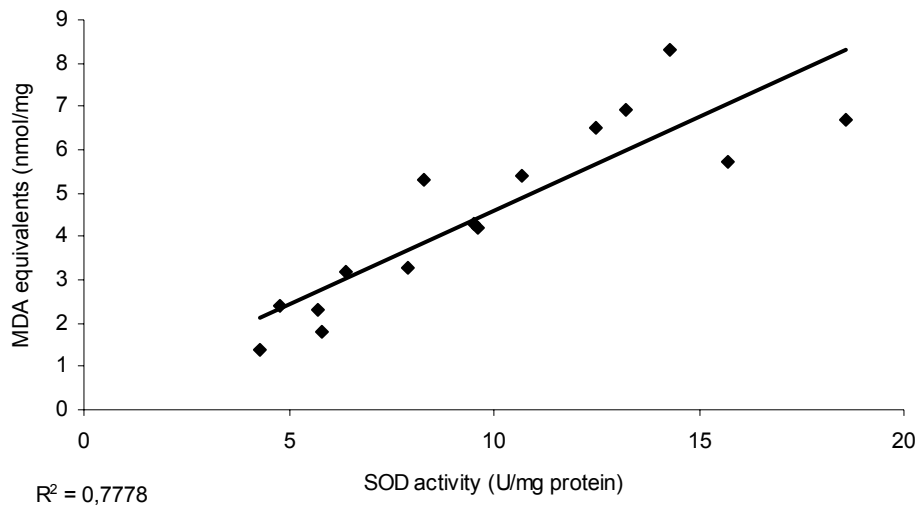
1 B: Atividade plasmática precoce de SOD e dano oxidativo tardio em proteínas no fígado



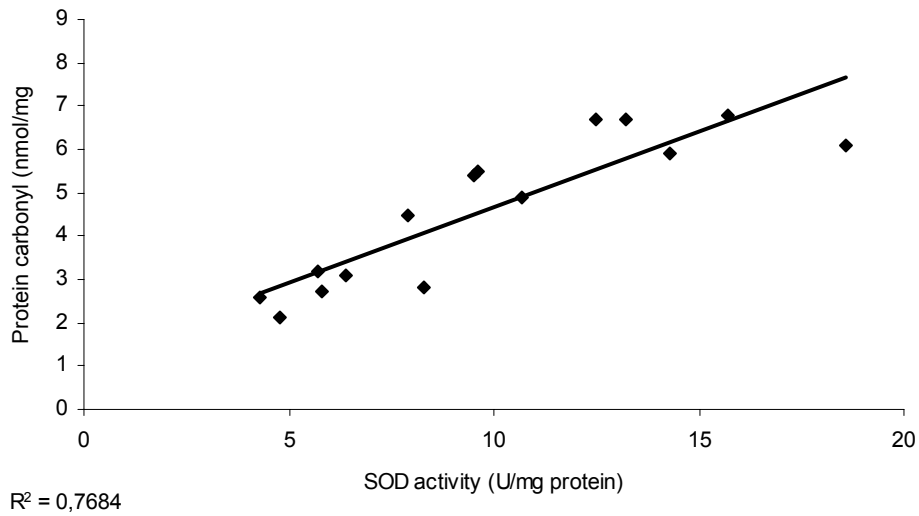
1 C: Atividade plasmática precoce de SOD e peroxidação lipídica tardia nos pulmões



1 D: Atividade plasmática precoce de SOD e dano oxidativo tardio em proteínas nos pulmões

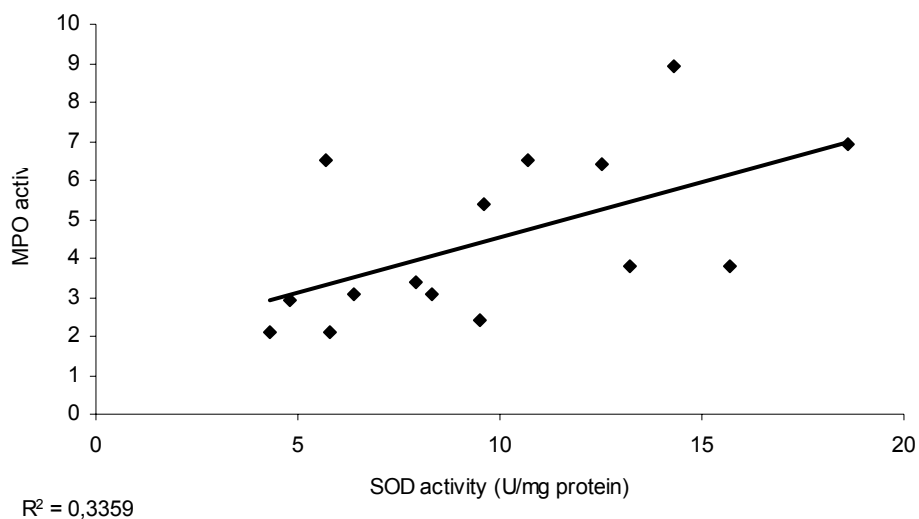


1 E: Atividade plasmática precoce de SOD e peroxidação lipídica tardia nos rins

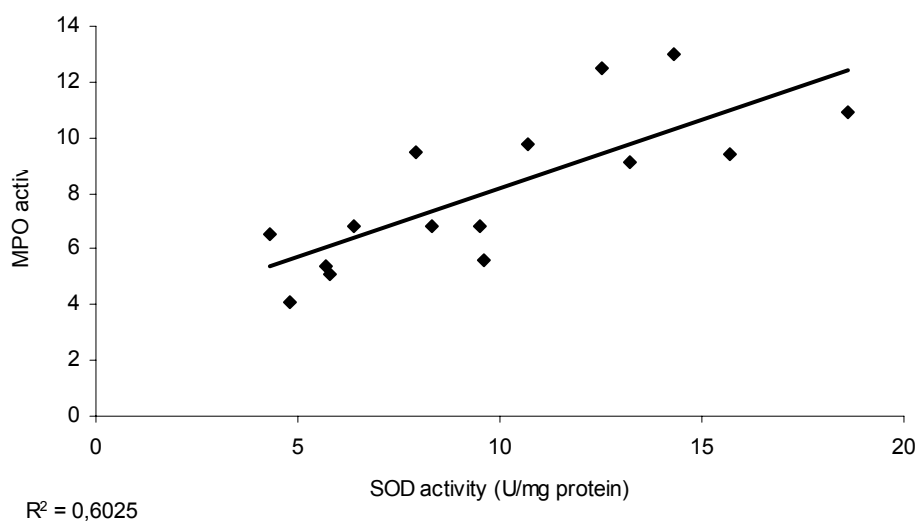


1 F: Atividade plasmática precoce de SOD e dano oxidativo tardio em proteínas nos rins

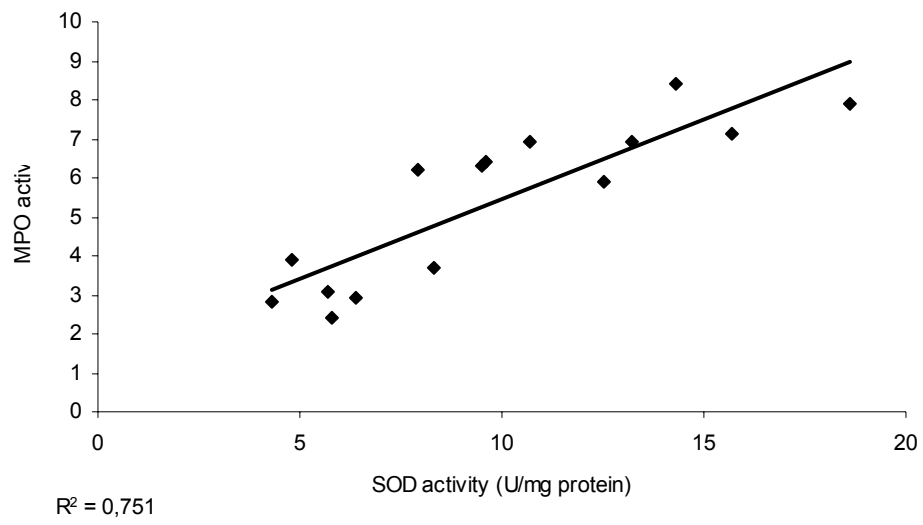
Figura 2 A-C: Correlação de atividade plasmática de SOD com atividade de mieloperoxidase no fígado, pulmões e rins



2 A: Correlação entre atividade plasmática precoce de SOD e atividade tardia de mieloperoxidase no fígado

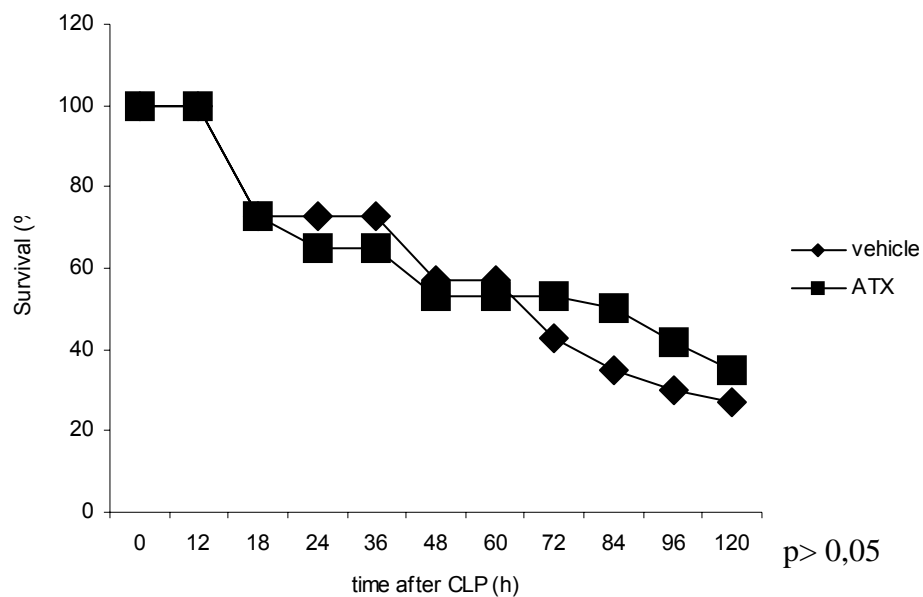


2 B: Correlação entre atividade plasmática precoce de SOD e atividade tardia de mieloperoxidase nos pulmões

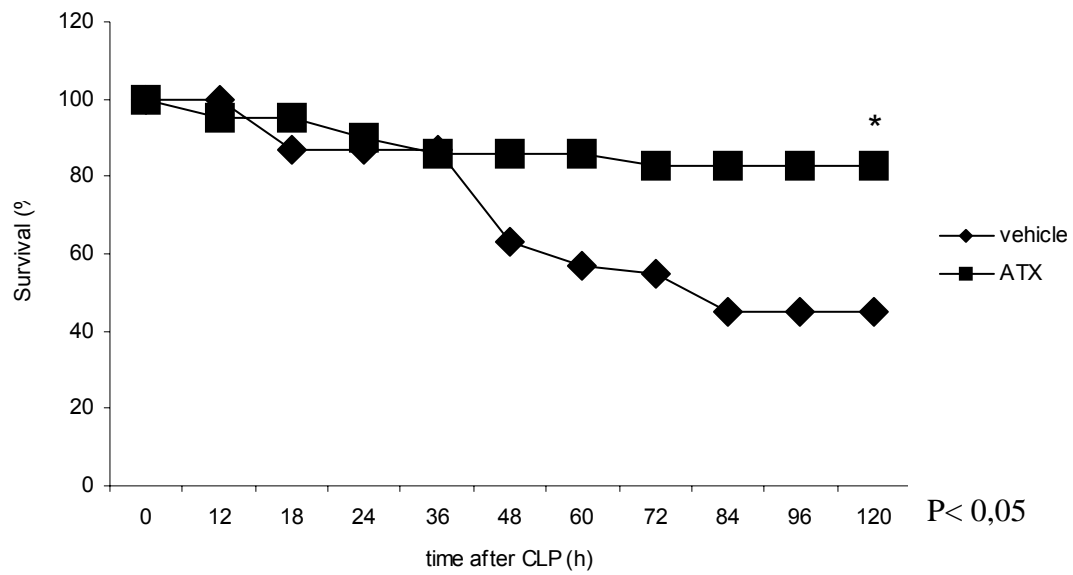


2 C: Correlação entre atividade plasmática precoce de SOD e atividade tardia de mieloperoxidase nos rins

Figura 3: Suporte básico (Vehicle) versus suporte básico e antioxidantes (ATX) administrados 3 horas após a indução de sepse por CLP conforme níveis plasmáticos precoces de SOD

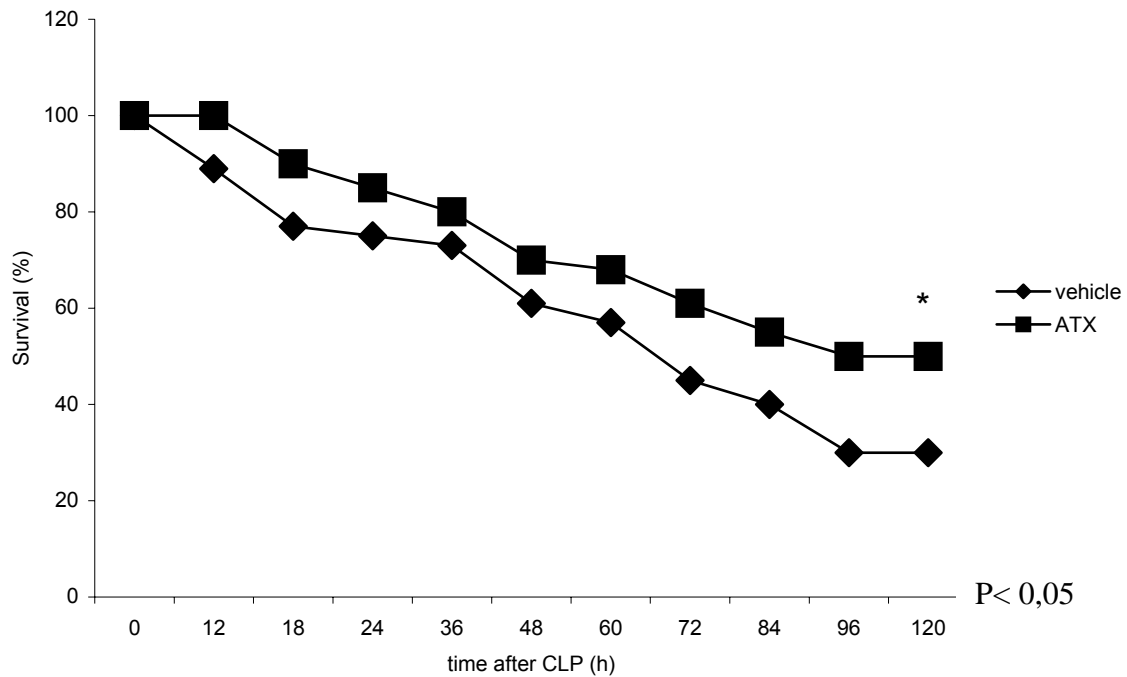


3 A: Comparação de sobrevida em animais com atividade de SOD plasmática precoce > 10U/mg proteína entre animais que receberam suporte básico e os que receberam suporte básico e antioxidantes.

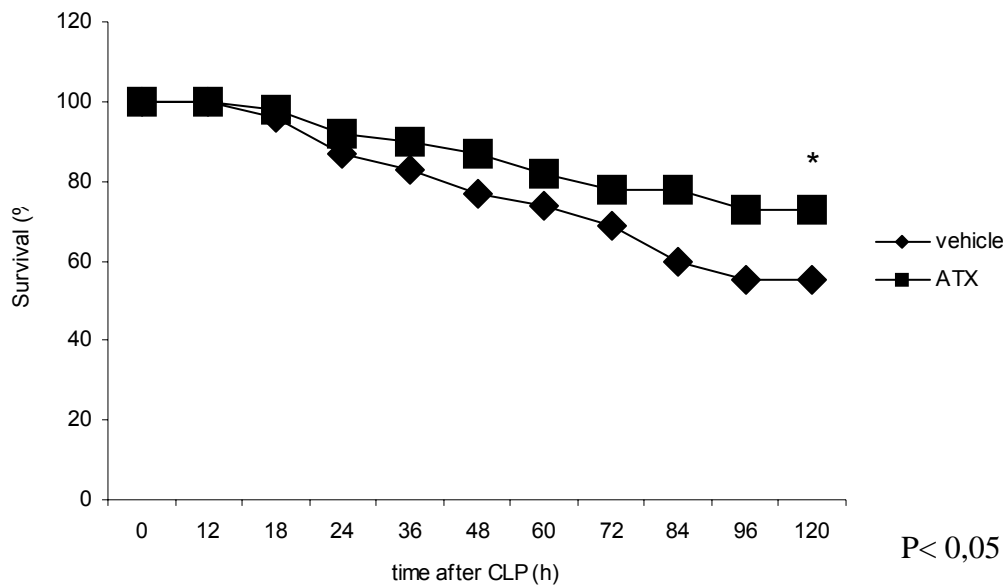


3 B: Comparação de sobrevivência em animais com atividade de SOD plasmática precoce < 10U/mg proteína entre animais que receberam suporte básico e os que receberam suporte básico e antioxidantes

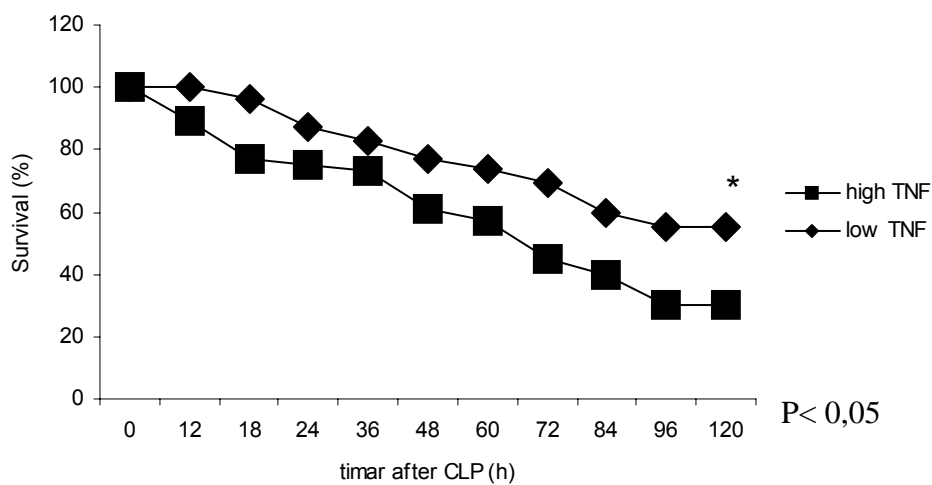
Figura 4: Suporte básico (vehicle) versus suporte básico e antioxidantes (ATX) administrados nas primeiras 3 horas após a indução de sepse por CLP conforme níveis plasmáticos precoces TNF α .



4 A: Comparação de sobrevivência em animais com níveis plasmáticos precoces de TNF α > 1200pg/mg proteína entre animais que receberam suporte básico e os que receberam suporte básico e antioxidantes.

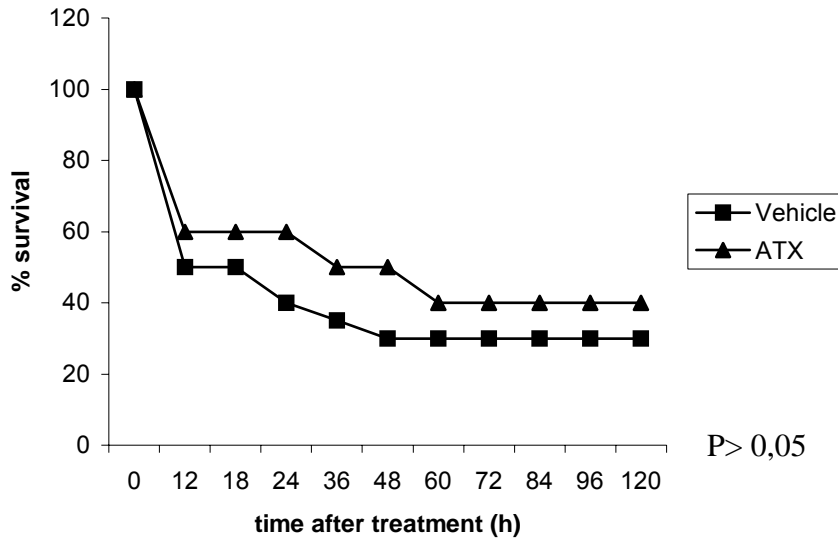


4 B: Comparação de sobrevivência em animais com níveis plasmáticos precoces de TNF α <1200pg/mg proteína entre animais que receberam suporte básico e os que receberam suporte básico e antioxidantes.

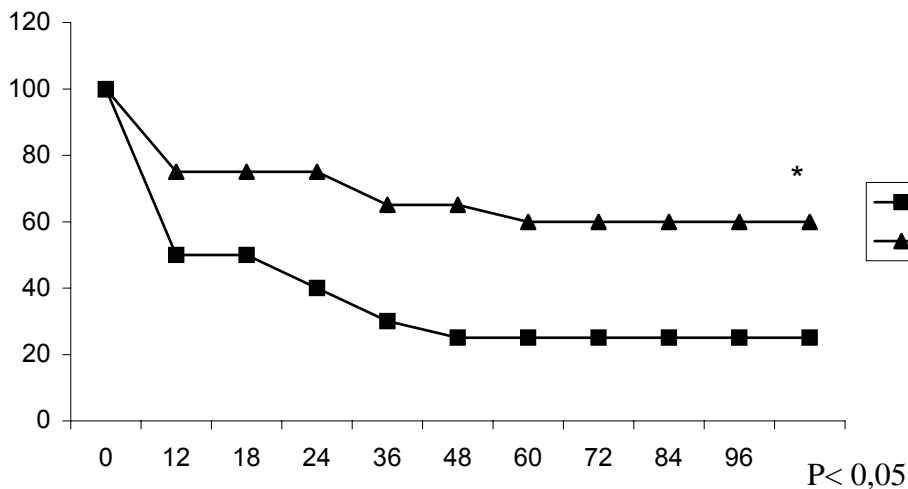


4C: Relação entre mortalidade e níveis plasmáticos precoces de TNF- α .

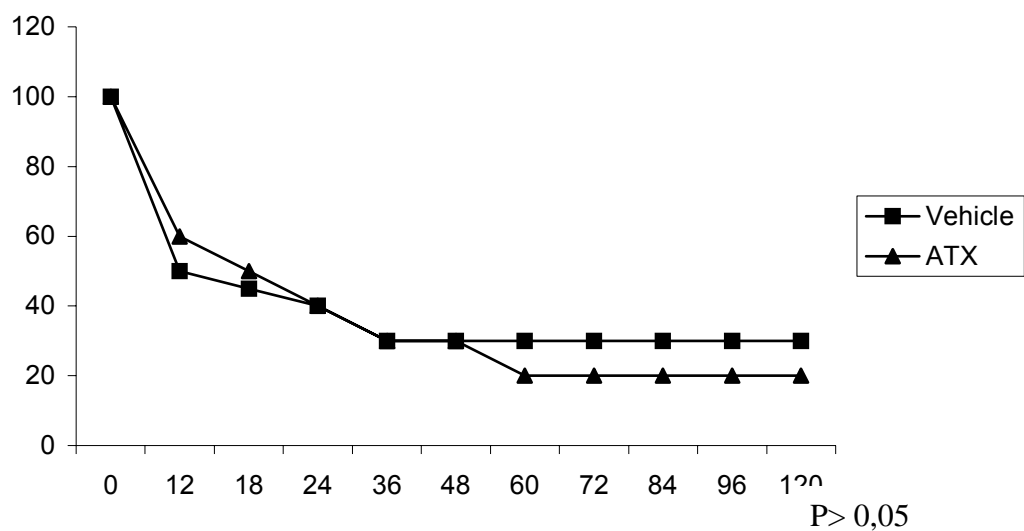
Figura 5: Suporte básico (vehicle) versus suporte básico e antioxidantes (ATX) administrados 12 horas após a indução de sepse por CLP conforme níveis plasmáticos precoces de SOD.



5 A: Comparação entre animais que receberam suporte básico (vehicle) e os que receberam suporte básico mais antioxidantes (ATX) após 12h de indução de sepse.



5 B: Comparação entre animais com níveis de SOD < 10U/mg de proteína, que receberam suporte básico (vehicle) e os que receberam suporte básico mais antioxidantes (ATX) após 12h de indução de sepse.



5 C: Comparação entre animais com níveis de SOD > 10U/mg de proteína, que receberam suporte básico (vehicle) e os que receberam suporte básico mais antioxidantes (ATX) após 12h de indução de sepse.

Figura 6: Curva ROC comparando sensibilidade e especificidade de APACHE II, MODS, SOD e Carbonyl com mortalidade

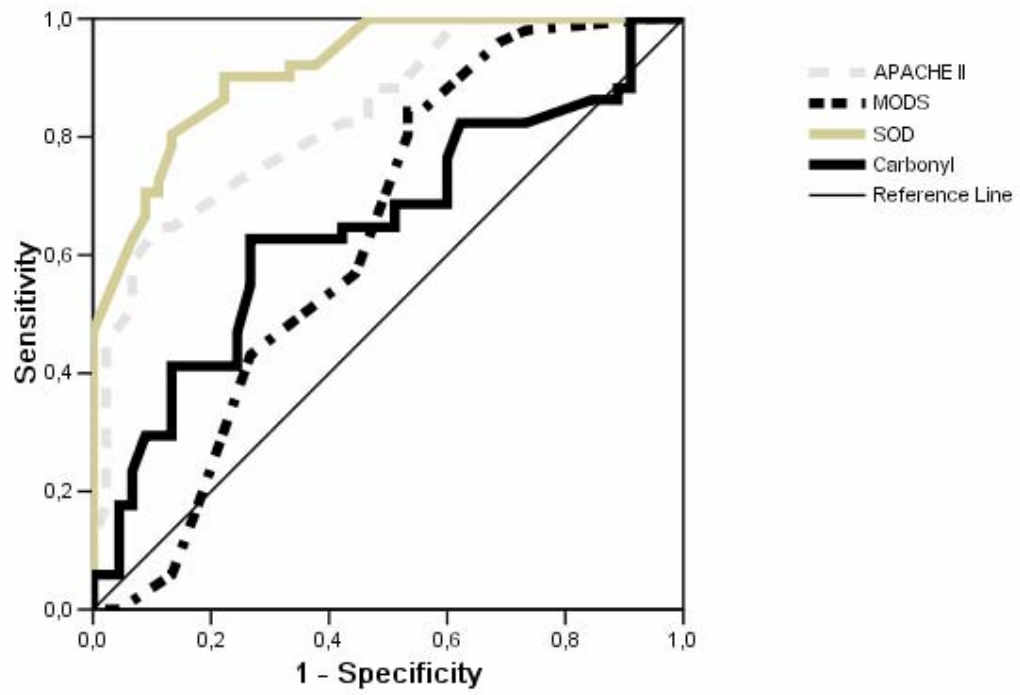


Figura 7 - Correlação entre atividade plasmática de SOD e dose de norepinefrina em pacientes com sepse

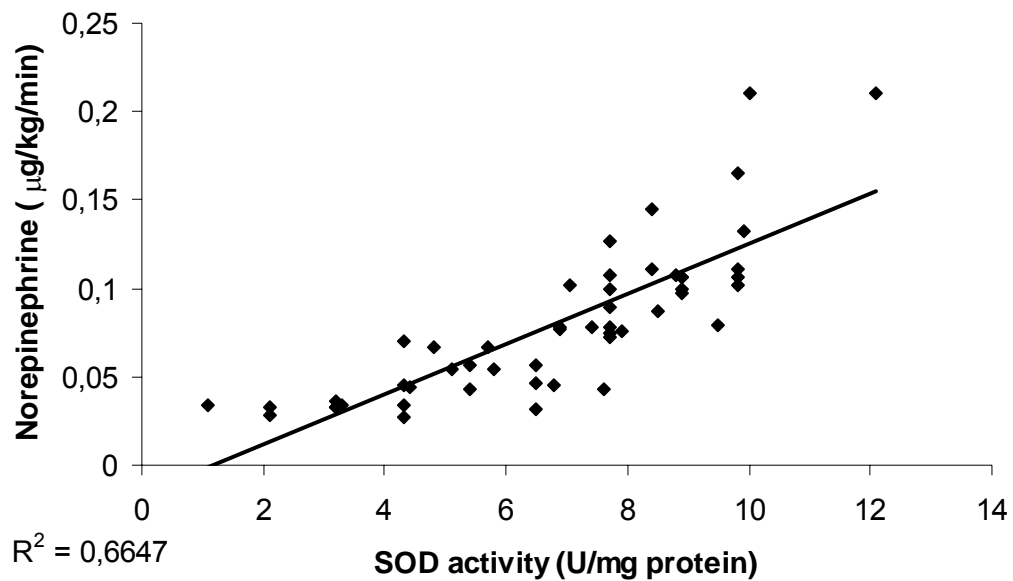


Tabela 1: Correlação entre idade, escores de gravidade, marcadores de estresse oxidativo na mortalidade em UTI

	Sobrevivente	Não-sobrevivente	p
<i>Idade</i>	54.0 ± 14.4	58.7 ± 13.4	0.101
<i>Sexo</i>			
Masculino	30	29	0.402
Feminino	15	22	
<i>Gravidade</i>			
Sepse	21	0	
Sepse grave	11	24	< 0.01
Choque séptico	13	27	
<i>APACHE II</i>	16.2 ± 7.7	27.4 ± 7.7	< 0.01
MODS	8.6 ± 4.07	10.5 ± 2.48	< 0.01
SOD (U/mg proteína)	3.96 ± 2.08	7.83 ± 1.68	< 0.01
Carbonil (nmol/mg proteína)	2.38 ± 1.69	3.49 ± 2.24	< 0.01
Catalase (U/mg proteína)	3.14 ± 1.27	3.65 ± 1.36	0.06
TBARS (nmol/mg proteína)	0.30 ± 0.22	0.32 ± 0.11	0.54

Tabela 2: Relação entre marcadores de estresse oxidativo plasmático e necessidade de droga vasoativa em paciente com sepse.

	<i>Droga Vasoativa</i>		<i>p</i>
	<i>Sim</i>	<i>Não</i>	
<i>SOD (U/mg proteína)</i>	6,97 ± 2.23	4.84 ± 2.77	<0.001
<i>CAT (U/mg proteína)</i>	3.64 ± 1.35	3.11 ± 1.27	0.055
<i>TBARS (nmol/mg proteína)</i>	0.30 ± 0.14	0.31 ± 0.20	0.862
<i>Carbonil (nm/mg proteína)</i>	3.59 ± 2.35	2.19 ± 1.29	0.001

Referencias

1. Barriere SL, Lowry SF (1995). An overview of mortality risk prediction in sepsis. *Crit Care Med* 23: 376- 393.
2. Martin GS, Manino DM, Eathon S, Moss M (2003). The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348:1546-5.
3. Hoyert DL, Arias E, Smith BL, Murphy SL, Kochanek KD (1999). Deaths final data from 1999. *National vital statistics report CDC* 49: 8.
4. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR (2001). Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 29:1303–1310.
5. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulmé R, Lepage E, Le Gall J (2002). Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Int Care Med* 28: 108-121.
6. Annane D, Aegerter P, Jars-Guinestre MC, Guidet B (2002). Current Epidemiology of Septic Shock The CUB-Re´a Network. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 165–172.
7. Silva E, Pedro MA, Sogayar ACB (2004). Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care* 8: R251-R260.
8. Salvemini D, Cuzzocrea S (2002). Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med* 33:1173–1185.
9. Andrades M, Ritter C, Moreira JCF, Dal-Pizzol F (2005). Oxidative Parameters Differences during *Non-Lethal* and *Lethal* Sepsis Development. *J Surg Res* 125: 68–72.

10. Ritter C, Andrandes M, Frota MLC, Bonatto F, Pinho RA, Polydoro M, Klamt F, Pinheiro CT, Menna-Barreto SS, Moreira JC, Dal-Pizzol F (2003). Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Int Care Med* 29:1782–1789.
11. Ettore Crimi, Vincenzo Sica, Sharon Williams-Ignarro, Haibo Zhang, Arthur S. Slutsky, Louis J. Ignarro, Claudio Napoli (2006). The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Rad Biol Med* 40: 398 – 406.
12. Eichacker PQ, Parent C, Kalil A, Esposito C, Cui X, Banks SM, Gerstenberger EP, Fitz Y, Danner RL, Natanson C (2002). Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 166(9):1197-1205.
13. Remick DG, Bolgos GE, Siddiqui J (2003). Inflammatory status in sepsis alters efficacy of interleukin-18 binding protein therapy. *Crit Care Med* 31:2096–2101.
14. Warner A, Bencosme A, Healy D, Verme C (1995). Prognostic role of antioxidant enzymes in sepsis: preliminary assessment. *Clin Chem* 41: 867-71.
15. Motoyama T, Okamoto K, Kukita I, Hamaguchi M, Kinoshita Y, Ogawa H (2003) Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 31:1048 –1052.
16. Winterbourn CC, Buss IH, Chan TP, Plank LD, Clark MA, Windsor JA (2000). Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Crit Care Med* 28(1):143-9.
17. Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Webster NR (1995) Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med* 23(4):646-51.
18. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH (1980) Sepsis and septic shock—A review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 29:189–199.

19. Ritter C, Andrades M, Reinke A, Menna-Barreto SS, Moreira JCF, Dal-Pizzol F (2004). Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves mortality in sepsis. *Crit Care Med* 32: 342.
20. American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee (1992). Definitions of sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 101: 1644-1655.
21. Draper HH, Hadley M (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186:421–431.
22. Levine R L, Garland D, Oliver CN (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186: 464.
23. Liaudet L, Mabley JG, Soriano FG (2001) Inosine reduces systemic inflammation and improves survival in septic shock induced by cecal ligation and puncture. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1213–122.
24. Aebi H (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121.
25. Bannister JV, Calabrese L (1987). Assays for SOD. *Methods Biochem Anal* 32: 279.
26. Abraham E (1999). Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis. *Intensive Care Med* 25:556–566.
27. Veja AJM, Diaz J, Serrano E, Carbonell LF (2002). Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 30(8):1782-1786.
28. Fattman CF, Schaefer LM, Oury TD (2003). Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med* 35(3):236-256.
29. Gielen S, Schuler G, Hambrecht R (2001). Exercise training in coronary artery disease and coronary vasomotion. *Circulation* 103: pp. E1–E6.

30. Luoma JS, Stralin P, Marklund SL, Hiltunen TP, Sarkioja T, Herttuala SY (1998). Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions colocalization with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 18: 157–167.
31. Carlsson LM, Jonsson J, Edlund T, Marklund SL (1995). Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6264–6268.
32. Folz RJ, Abushamaa AM, Suliman HB (1999). Extracellular superoxide dismutase in the airways of transgenic mice reduces inflammation and attenuates lung toxicity following hyperoxia, *J. Clin. Invest* 103: 1055–1066.
33. McCord JM, Gao B, Leff J, Flores SC (1994). Neutrophil-generated free radicals possible mechanisms of injury in adult respiratory distress syndrome. *Environ. Health Perspect* 102: S10: 57–60.

Considerações finais:

Neste trabalho demonstrou-se que, além de um aumento da atividade da superóxido dismutase poder contribuir para o dano oxidativo em muitos órgãos após a indução de sepse, parâmetros oxidativos foram associados com gravidade e desfecho de sepse em uma UTI geral, e puderam prever resposta ao tratamento antioxidante em modelo animal.

Um melhor entendimento da fisiopatologia da sepse, e sua relação com o sistema antioxidante, além, da identificação de marcadores precoces de mortalidade através de trabalhos experimentais, pode fornecer dados preliminares e novos protocolos de tratamento, para serem posteriormente validados em ensaios clínicos e empregados na prática médica.