

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

IMPORTÂNCIA DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES NA
PROGRESSÃO DA SEVERIDADE DA SEPSE

Mestrando: Michael Everton Andrades

Orientador: Dr. Felipe Dal Pizzol

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, como requisito para obtenção do
grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, 2006

Esse trabalho foi realizado no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Fisiopatologia, Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Pró-Reitoria de Pesquisa desta Universidade (PROPESQ/UFRGS) e pela Diretoria de Pós-Graduação da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Agradecimentos:

Ao José Cláudio Fonseca Moreira e ao Felipe Dal Pizzol, que foram excelentes professores, orientadores e amigos.

Aos colegas e amigos do laboratório.

Aos colegas e amigos do departamento, em especial ao Eduardo Link Guimarães, Luiz Fernando de Souza e Fernanda Bonatto.

Aos professores e funcionários do departamento de Bioquímica.

A minha família.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

ÍNDICE

PARTE I	1
Resumo	2
Abstract	3
Abreviaturas	4
1. Introdução	5
1.1 Sepses	5
1.1.1 Histórico e definição	5
1.1.2 Epidemiologia	6
1.1.3 Tratamentos	7
1.1.4 Modelos animais de sepses	8
1.2 Radicais Livres	10
1.2.1 Histórico e definição	10
1.2.2 Ânion superóxido	11
1.2.3 Peróxido de hidrogênio	11
1.2.4 Radical hidroxil	11
1.2.5 Radical peroxil	12
1.2.6 Principais defesas antioxidantes	13
1.2.7 Papel fisiológico dos radicais livres	15
1.2.8 Papel patológico dos radicais livres	15
1.3 Radicais livres e sepses	17
2. Objetivos do trabalho	18
PARTE II	19
Capítulo 1	20
Capítulo 2	25
PARTE III	47
Discussão	48
Referências	55

PARTE I

Resumo

A sepse é uma síndrome inflamatória sistêmica decorrente de uma infecção que pode causar sérios danos a todos os órgãos do paciente, podendo levá-lo à morte. Dados epidemiológicos norte americanos estimam que 750.000 pacientes são acometidos a cada ano por sepse. A taxa de mortalidade varia de 20 a 60%, dependendo da severidade, sendo semelhante para o Brasil. A terapia utilizada é o tratamento com antibióticos, manutenção de pressão sanguínea e ventilação mecânica, que apesar de extremamente caros ainda se mostram com baixa eficiência, tornando a morte por sepse em UTI mais relevante que mortes por câncer de mama ou AIDS, nos EUA. Tratamentos que demandam grande soma de recursos tendem a ser um grande problema para países como o Brasil, que através do Sistema Único de Saúde, supre o paciente com a terapêutica disponível. Por isso, a compreensão da doença e o desenvolvimento de terapias alternativas mais eficazes e mais baratas são de extrema importância. Neste sentido, diversas terapias alternativas têm sido propostas (insulinoterapia, administração de proteína C ativada - Drotrecogina alfa®, antioxidantes ou anticorpos anti-citoquinas). Radicais livres são fisiologicamente produzidos pela mitocôndria e por outras enzimas, como a NADPH oxidase e xantina oxidase. Os organismos contam com defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas para não sofrer danos causados pela própria produção de radicais livres e assim, manter a homeostase celular. Na sepse, a primeira linha de defesa do organismo é o seu sistema imunológico inato mediado por fagócitos que possuem sistemas bactericidas compostos por enzimas produtoras de radicais livres e espécies reativas de oxigênio. Quando a resposta inflamatória à infecção é exagerada e a homeostase é perdida, verificam-se danos a biomoléculas dos tecidos do hospedeiro devido à própria produção de radicais livres. Estes danos podem levar a um comprometimento celular que pode progredir para disfunção orgânica e colaborar para a morte do indivíduo. Devido à importância dos radicais livres no estabelecimento e na progressão da sepse, nós formulamos a hipótese de que o balanço entre as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), bem como os produtos de dano às biomoléculas (carbonilas e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS), podem ser importantes marcadores de severidade e de prognóstico da sepse. Nossos resultados demonstram que há um aumento na atividade da SOD sem um aumento compensatório da CAT em todos os órgãos analisados (pulmão, diafragma, coração, fígado, rim), retirados de ratos submetidos a sepse. Este desequilíbrio resulta em dano a biomoléculas (lipídeos e proteínas). Os dados sugerem que os níveis de proteínas carboniladas, mas não de TBARS, estão correlacionados com a severidade da sepse. A consequência do aumento de carbonilas na resposta imunológica é discutida. Apesar da importância das proteínas carboniladas na progressão da sepse, nós demonstramos uma forte correlação positiva entre a relação SOD/CAT (pulmão e rim) vs. marcadores de falência desses órgãos bem como entre TBARS vs. marcadores de falência, em ratos submetidos a CLP. Estas correlações foram revertidas com a associação de tratamento antioxidante nesses animais. Estes dados sugerem que o equilíbrio entre a SOD e a CAT é muito importante para a manutenção da homeostase redox e que a suplementação antioxidante reverte o desequilíbrio visto na sepse, os níveis de TBARS bem como protege dano renal e respiratório.

ABSTRACT

Sepsis is a systemic inflammatory syndrome secondary to an infectious process that can progress to multiple organ failure and death. Epidemiological studies estimate that 750,000 cases of severe sepsis occurs per year in United States with mortality rate ranging between 20 and 60%, and these rates reflect the Brazilian reality. Sepsis is classically treated with antibiotics, pressure support and mechanic ventilation. However these treatments have little impact on mortality rate, which is higher for sepsis than for breast cancer or HIV. Thus, a better understanding of sepsis and the development of new therapeutic approaches are extremely important and several researches have been developed in this way (e.g. insulin-therapy, activated-protein C - Drotrecogin alfa®, antioxidants and anti-cytokine antibodies). Free radicals are released normally in cell physiology. Organisms have enzymatic antioxidant defenses as well as non-enzymatic antioxidant defenses to counteract the harmful effects of free radicals and to maintain cellular homeostasis. In the onset of an infectious process like sepsis, the innate immune system is the first defense against pathogen and is carried out by macrophages and neutrophils. These cells are potent phagocytes and their bactericidal compounds include free radicals and reactive oxygen species. When the response to infection is exacerbated the homeostasis is lost and oxidative damage takes place. This damage could compromise cell function and lead the organ dysfunction and death. Considering the importance of free radicals in the onset and progression of sepsis we hypothesized that balance between superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), as well as molecular damage (carbonyl and thiobarbituric acid reactive species - TBARS), could be important markers of severity and prognosis in sepsis. We show an increase in SOD activity without a compensatory increase in catalase in the lung, diaphragm, heart, kidney and liver from rat submitted to sepsis. This imbalance contributes to oxidative damage in lipids and proteins. The data suggests that carbonyl levels but not TBARS levels are linked to sepsis severity and the implication of carbonyl upon immune response is discussed. In spite of the relevance of carbonyl in sepsis progression we found a positive correlation between SOD/CAT ratio (in kidney and lung) and organ failure markers, as well as between TBARS and organ failure markers, in rats submitted to CLP. These are prevented treating animal with antioxidants. These data suggest the importance of a coupled enzymatic activity of SOD and CAT to maintain redox homeostasis. Moreover, the antioxidant treatment reversed the SOD/CAT imbalance, TBARS levels and organ impairment.

ABREVIATURAS

SOD – Superoxido dismutase

CAT – catalase

GPx – Glutaciona peroxidase

GSH – glutaciona

TBARS – Thiobarbituric acid reactive substances

NAC – N-acetilcisteína

DFX – deferoxamina

LPS – Lipopolissacarídeo

TNF – *Tumor Necrosis Factor*

HMG-B1 – *High Mobility Group Box 1*

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

iNOS – *Inducible Nitric Oxide Synthase*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sepses

1.1.1 Histórico e definição

A sepse é uma síndrome inflamatória sistêmica de etiologia diversa e com uma ampla forma de apresentação. Estas características contribuem para dados conflitantes encontrados com frequência na literatura científica.

A primeira possível citação sobre sepse encontrada na história da medicina é atribuída a Hipócrates:

“Quando a febre é contínua, a superfície externa do corpo está fria, e existe internamente uma grande sensação de calor e sede, a afecção é mortal”

Hipócrates, 400 A.C.

Em 1991 o *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine* estabeleceu critérios claros para o diagnóstico da sepse, bem como de outras co-morbidades (Bone *et al*, 1992). Ficaram estabelecidos os seguintes critérios:

SIRS – Systemic Inflammatory Response Syndrome

(Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica)

- Febre (> 38,3°C) ou hipotermia (< 36°C);
- Taquicardia (> 90 batimentos/min);
- Taxa respiratória (> 20 respirações/min ou PaCO₂ < 32mmHg);
- Leucocitose (> 12.000/mm³) ou leucopenia (< 4.000/mm³) ou > 10% de células imaturas.

Sepses

- Presença de duas ou mais condições verificadas na SIRS.
- Evidência de infecção.

Sepse severa

- Sepses associada com disfunção orgânica, hipoperfusão ou hipotensão – presença de acidose láctica, oligúria, alteração aguda do estado mental.

Choque séptico

- Hipotensão decorrente da sepses (pressão sistólica < 90mmHg ou uma redução > 40mmHg da linha de base);
- Persistência da hipotensão mesmo com reposição de fluidos.
- Necessidade de administração de agentes vasopressores (dopamina, adrenalina, noradrenalina, vassopressina).

MODS – *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*

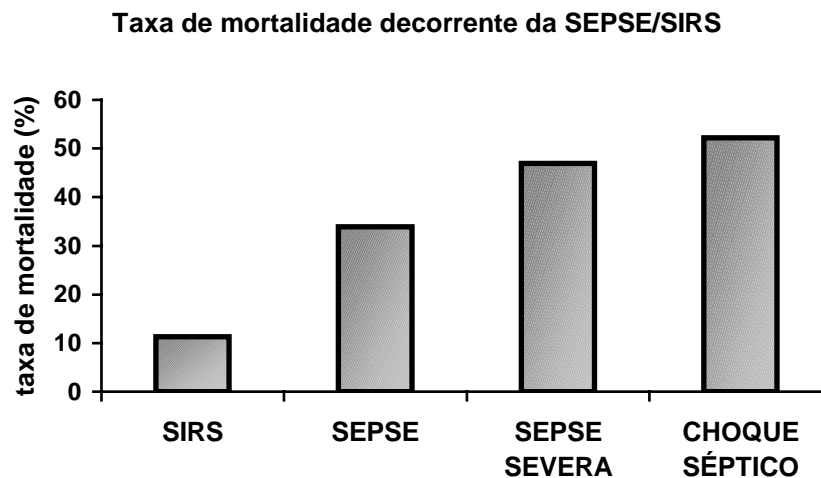
(Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgão)

- Presença de função alterada de órgãos em pacientes criticamente doentes que necessitam de suporte para manter a homeostase.

1.1.2 Epidemiologia

Estimativas epidemiológicas mostram que ocorrem 750.000 casos de sepses severa por ano nos EUA com um custo de aproximadamente 20 bilhões de dólares (Angus *et al*, 2001). Estes pacientes ficam, geralmente, hospitalizados por 2 a 3 semanas, o que contribui para o desenvolvimento de co-morbidades e para o elevado índice de mortalidade. A mortalidade global apresentada no estudo de Angus *et al*. foi de 28,6%. No Brasil foram realizados poucos estudos epidemiológicos consistentes. Em maio de 2001 iniciou-se um

importante estudo intitulado BASES (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*) que abrange cinco grandes centros (Silva *et al*, 2004).



Taxa de mortalidade avaliada pelo estudo BASES (Silva *et al*, 2004) em cinco grandes Centros de Terapia Intensiva no Brasil.

Os dados apresentados pelo BASES demonstram a importância que tem a sepse nas UTIs do Brasil.

1.1.3 Tratamentos

A terapêutica clássica utilizada no controle da sepse é aplicada na tentativa de combater a infecção bem como as consequências da SIRS sobre os sistemas orgânicos e para isso lança mão da administração de antibióticos, reposição de fluidos e agentes vasopressores, ventilação mecânica e controle da febre (Rivers *et al*, 2005).

Apesar de todos estes esforços o resultado ainda é insuficiente, uma vez que a mortalidade pode chegar a 60% mesmo com o investimento de 20 bilhões de dólares por ano (Angus *et al*, 2001).

Por isso vem sendo desenvolvida uma terapêutica suplementar com diversos agentes, como por exemplo, insulinoterapia (van den Berghe *et al*, 2001), anti-TNF α (Eskandari *et al*, 1992), anti-HMG-B1 (Wang *et al*, 1999),

proteína C ativada (APC) (Bernard *et al*, 2001) e antioxidantes (Macarthur *et al*, 2000; Paterson, Galley e Webster, 2003; Ritter *et al*, 2004). Dentre muitos, o único tratamento suplementar aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos foi a APC (Drotrecogin alfa – ativada®), mesmo assim para paciente sofrendo de sepse severa com elevada chance de mortalidade, uma vez que seus efeitos não se mostraram benéficos para pacientes com baixo risco de morte (Abraham *et al*, 2005). Mesmo considerando os benefícios fornecidos por este tratamento, seu custo é extremamente elevado, cerca de 7.000 dólares por paciente, com custo estimado de 160.000 dólares por vida salva (Angus *et al*, 2003).

1.1.4 Modelos animais de sepse

A sepse apresenta etiologia diversa e por isso é difícil a aplicação de um modelo que cubra todos os aspectos da doença. Por isso é importante a avaliação e o conhecimento do modelo a ser usado (Buras, Holzman e Sitkovsky, 2005). Abaixo, descrevo alguns dos modelos mais utilizados na pesquisa sobre sepse.

Endotoxemia

A administração de LPS intra venosa mimetiza o caráter inflamatório da doença, mas não as características hemodinâmicas (Buras, Holzman e Sitkovsky, 2005).

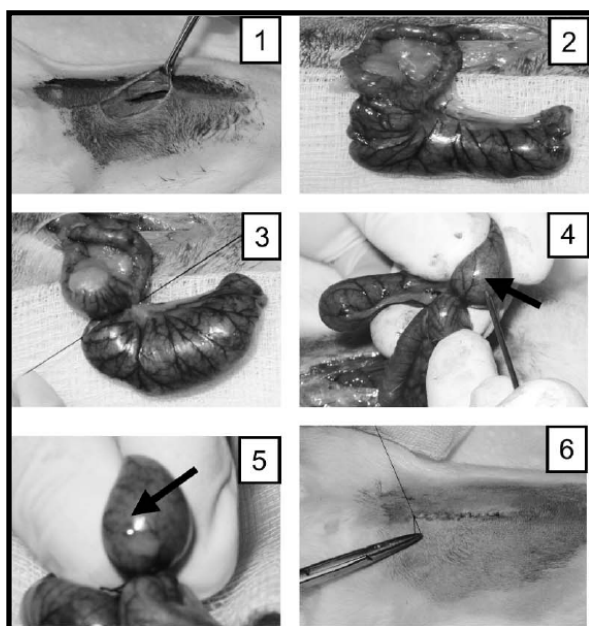
Inoculação de bactérias

Modelos com inoculação de bactérias (isoladas ou uma mistura da flora intestinal) podem não representar eficientemente uma infecção, uma vez que as bactérias podem ser rapidamente lisadas pelo sistema complemento e este modelo acaba se tornando próximo ao da administração de LPS. Além disso, a

espécie inoculada, bem como a cepa, pode influenciar na resposta inflamatória do animal (Buras, Holzman e Sitkovsky, 2005).

CLP – Cecal Ligation and Puncture - Ligamento e Punção Cecal

É considerado um modelo de sepse de alto padrão, uma vez que mimetiza sepse decorrente de uma peritonite causada por apendicite ou diverticulite. O processo de CLP é feito após uma laparotomia e consiste em ligar o ceco, junto à válvula íleo-cecal, sem interromper o trânsito fecal no intestino. Esse processo causa uma desvitalização e conseqüente necrose do órgão. A perfuração feita na face menos vascularizada promove a liberação de fezes no interior da cavidade peritoneal (Buras, Holzman e Sitkovsky, 2005).



Procedimentos para a realização do modelo CLP: Incisão média de cerca de 4cm (1), exposição do ceco (2), ligamento da base do ceco (3) com posterior punção da face menos vascularizada (4). Aplicar leve compressão (5) para causar extravasamento de pequena quantidade de fezes. Após, sutura-se o peritônio e a pele (6). Figura extraída de Hubbard *et al*, 2005.

Após o processo o animal é suturado e recebe uma administração de NaCl 0,9% (30mL/kg) com o objetivo de mimetizar as características hiperdinâmicas iniciais da sepse .

É importante ressaltar que a severidade deste modelo é relacionada tanto ao diâmetro da agulha usada na punção cecal (Otero-Anton *et al*, 2001)

quanto com o tamanho do ceco que será desvitalizado (Singleton e Wischmeyer, 2003). Portanto, controlando-se bem essas duas variáveis este modelo favorece o estudo em diversos estágios da doença. Devido às facilidades e vantagens oferecidas pelo modelo, nós optamos por usá-lo neste trabalho.

1.2 Radicais Livres

1.2.1 Histórico e Definição

O elemento oxigênio existe na atmosfera em forma molecular (O_2). Exceto para alguns organismos unicelulares anaeróbios e aero-tolerantes, todos os animais, plantas e bactérias necessitam de oxigênio para produção eficiente de energia pelo uso da cadeia transportadora de elétrons. No entanto, durante a respiração celular cerca de 1 a 3% do oxigênio metabolizado produz espécies reativas de oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 1999). Contudo, a necessidade vital de O_2 traz consigo um paradoxo presente no fato de que o oxigênio pode ser um gás mutagênico e tóxico e que organismos aeróbios sobrevivem devido às suas defesas antioxidantes, como veremos mais adiante.

Radicalis livres são moléculas ou átomos capazes de existência independente que contém um ou mais elétrons desemparelhados, conferindo assim uma característica de alta reatividade. Essa é uma definição ampla e é bom lembrar que a reatividade dos radicalis livres varia grandemente entre estas moléculas ou átomos. Os radicalis livres mais conhecidos até hoje são: superóxido (O_2^{\bullet}), hidroxil ($^{\bullet}OH$), peroxil (RO_2^{\bullet}), alcoxil (RO^{\bullet}), hidroperoxil (HO_2^{\bullet}) e óxido nítrico (NO^{\bullet}) (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) incluem os radicais livres bem como outros compostos não-radicalares que sejam potencialmente formadoras de radicais livres por meio de outras reações. Entram nesta classificação o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso (HOCl), o ozônio (O_3), o oxigênio singleto e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (Halliwell e Gutteridge, 1999).

1.2.2 Ânion superóxido

Quando um elétron é adicionado à molécula de oxigênio, tem-se a formação do radical mais abundante na célula: o ânion superóxido. Embora esse radical não seja altamente reativo, uma das principais teorias para explicar a toxicidade do O_2 propõe que a toxicidade é devido à superprodução de ânion superóxido em algumas situações. Apesar de possuir baixa reatividade, reage rapidamente com moléculas como o óxido nítrico. As principais fontes de superóxido em sistemas biológicos são na cadeia transportadora (cerca de 1 a 3% do oxigênio reduzido na mitocôndria pode formar $O_2^{\bullet-}$) de elétrons, NADPH oxidase e xantina oxidase (Halliwell e Gutteridge, 1999).

1.2.3 Peróxido de hidrogênio

Embora o peróxido de hidrogênio não seja um radical livre, essa espécie reativa de oxigênio tem grande importância porque, a partir dele, quando escapa aos sistemas endógenos de defesa, haverá a formação do radical livre hidroxil, que é a espécie mais reativa dentre todos os radicais livres de oxigênio. Além disso, essa molécula possui alta capacidade de difusão (Halliwell e Gutteridge, 1999).

1.2.4 Radical hidroxil

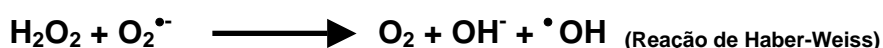
Devido a sua grande capacidade de reagir com biomoléculas, $\cdot\text{OH}$ é provavelmente a espécie reativa capaz de causar mais danos em sistemas biológicos do que qualquer outra (Halliwell e Gutteridge, 1999). O radical é formado a partir do H_2O_2 em uma reação catalisada por íons metálicos (Fe^{2+} e Cu^+), reação esta conhecida como Reação de Fenton:



Além disso, o íon superóxido exerce um importante papel reciclando os íons metálicos da reação de Fenton:



A soma dessas duas reações é chamada de Reação de Haber-Weiss (Fridovich, 1997). Ou seja, o ânion superóxido cede um elétron ao peróxido de hidrogênio, tornando-se uma molécula estável (oxigênio molecular). Ao receber esse elétron, o H_2O_2 descompartilha o par de elétrons da união covalente, formando o íon hidroxila (OH^-) e o outro fica com sete elétrons, formando o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), como pode ser visto na reação abaixo:



1.2.5 Radical peroxil

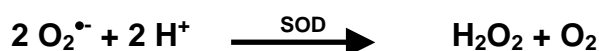
O radical peroxil é um peróxido orgânico e reage com biomoléculas (lipídios, proteínas e DNA) da mesma forma que o radical $\cdot\text{OH}$, podendo ser formado pelo ataque do radical $\cdot\text{OH}$ a compostos orgânicos ou pela decomposição de peróxidos orgânicos (ROOH). A reatividade desse radical está relacionada com a parte orgânica do mesmo, sendo os radicais aromáticos menos reativos (Halliwell e Gutteridge, 1999).

1.2.6 Principais defesas antioxidantes

Para defender o organismo do efeito das ERO os organismos contam com a combinação de diversos sistemas antioxidantes, que podemos dividir em dois grupos: antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

Antioxidantes enzimáticos

Superóxido dismutase (SOD) – Enzima encarregada em reduzir o superóxido em peróxido de hidrogênio:



Esta enzima existe em três isoformas: uma mitocondrial (Mn-SOD) uma citosólica (Cu, Zn-SOD dimérica) e uma extracelular (Cu, Zn-SOD tetramérica). A SOD foi a primeira enzima capaz de metabolizar ERO a ser descoberta (McCord e Fridovich, 1969). O peróxido de hidrogênio já foi demonstrado como inibidor da sua atividade (Bray *et al*, 1974). Trabalhos demonstram que a SOD pode ter um efeito pró-oxidante, visto que uma elevada atividade sem aumento compensatório da atividade da catalase promoveria um excesso de peróxido, que poderia reagir com metais e formar o radical hidroxil (Kelner *et al*, 1995).

Catalase (CAT) – É uma heme-enzima e encontra-se localizada predominantemente em peroxissomos, onde catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular:



Sua atividade pode ser inibida pela ação do superóxido. Essa inibição recíproca pelo substrato de uma enzima sobre a outra é vista como um mecanismo regulatório para que haja uma atividade acoplada entre as duas enzimas (Kono e Fridovich, 1982).

Glutathione peroxidase (Gpx) - Existem pelo menos quatro tipos de Gpx nos mamíferos (Gpx1-4), todas contendo selenocisteína. Todas as Gpx podem catalisar a redução de H₂O₂ utilizando glutathione como substrato. Além disso, a Gpx também reduz outros peróxidos orgânicos (ROOH) em álcool (Halliwell e Gutteridge, 1999).



Antioxidantes não enzimáticos

Glutathione (GSH) – O tri-peptídeo GSH (L-glutamil-L-cisteinil-L-glicine) exerce seus efeitos antioxidantes diretamente, por ser um agente redutor através de sua cisteína reduzida, ou indiretamente, através de enzimas como a GPx que usa a GSH como cofator no processo de redução (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Vitaminas – Diversos compostos bio-ativos são obtidos na alimentação. Destes, as vitaminas tem bastante destaque como antioxidantes. Podemos destacar vitaminas C (ascorbato), E (alfa-tocoferol) e A (retinol) como principais vitaminas antioxidantes. As vitaminas A e E são lipossolúveis e provavelmente exercem seus efeitos junto a lipídeos de membrana. Teriam assim uma importante função na manutenção da integridade celular. Apesar desse indicativo, tanto a vitamina A quanto a vitamina C já se mostraram características redox-ativas, podendo ser pró-oxidantes em determinadas situações (Murata e Kawanishi, 2000; Klamt, Roberto de Oliveira e Moreira, 2005). A vitamina C está envolvida na reciclagem da vitamina E e como cofator de cerca de oito enzimas (Halliwell e Gutteridge, 1999). Porém, a sua administração pode ser pró-oxidante em casos de excesso de ferro livre circulante, uma vez que o ferro é reduzido pela ação desta vitamina.

Além dos compostos citados acima, ocupam espaço como antioxidante o ácido úrico (Cherubini *et al*, 2005), flavonóides (Myhrstad *et al*, 2002), albumina e quelantes de metais (Fang, Yang e Wu, 2002).

1.2.7 Papel fisiológico dos radicais livres

Os organismos adaptados à presença de oxigênio dependem da existência de radicais livres. Pode parecer paradoxal, mas os radicais livres participam na sinalização celular e na defesa contra microorganismos invasores. Moléculas como peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e superóxido são potentes microbicidas e são produzidas em grandes quantidades por macrófagos e neutrófilos (Hampton, Kettle e Winterbourn, 1998). A produção de superóxido por estas células durante a defesa contra patógenos é feita primariamente pela NADPH oxidase. O superóxido, em presença de pH ácido do interior do vacúolo, transforma-se em peróxido de hidrogênio que é extremamente eficiente em matar bactérias causando dano direto ou através da ação do radical hidroxil. Além disso, o pH ácido do interior do vacúolo é propício para a ação da mieloperoxidase, enzima que forma ácido hipocloroso (HOCl) a partir de H₂O₂ e íons cloreto. O HOCl é descrito como potente bactericida e antifúngico (Halliwell e Gutteridge, 1999).

O óxido nítrico também pode ser citotóxico em níveis micromolares, mas a sua função mais conhecida é como agente vasodilatador produzido pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (Halliwell e Gutteridge, 1999).

1.2.8 Papel patológico dos radicais livres

Quando há um desequilíbrio entre a formação de ERO e a sua degradação pelos sistemas antioxidantes em favor do primeiro, estabelece-se

um quadro chamado de estresse oxidativo. Este quadro pode resultar em adaptações ou danos celulares (Halliwell e Gutteridge, 1999).

As adaptações ocorrem quando há baixos níveis de dano oxidativo que não comprometem a viabilidade celular. O estresse oxidativo funciona como um sinal para a célula, que responde com um aumento em suas defesas antioxidantes, adaptando-se para situações de estresse continuada (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Os danos celulares resultam de uma elevada produção de ERO que reagem com biomoléculas como carboidratos, DNA, lipídeos e proteínas. Os níveis de danos oxidativos podem ser avaliados através de medidas indiretas, como o a reação de aldeídos resultantes do ataque oxidativo a lipídeos com o ácido tiobarbitúrico (Draper e Hadley, 1990), ou técnicas diretas, como a reação da di-nitro-fenil-hidrazina com grupamentos carbonila em proteínas, resultante do ataque oxidativo sobre as mesmas (Levine, Garland e Olivier, 1990). Danos excessivos levam a uma disfunção celular, devido a um comprometimento do genoma, organelas e membranas. De fato uma produção excessiva de superóxido extramitocondrial pode acarretar danos nesta organela e assim promover um aumento na produção de superóxido pela cadeia transportadora de elétrons, bem como aumentar a permeabilidade de membrana mitocondrial e favorecer a liberação de fatores pró-apoptóticos (Halliwell e Gutteridge, 1999; Klamt *et al*, 2005).

Radicais livres e estresse oxidativo estão claramente associados a diversos processos patológicos como doença de Alzheimer, doenças priônicas, processos inflamatórios e também ocupam local de destaque em teorias sobre

envelhecimento (Halliwell e Gutteridge, 1999; Dal Pizzol *et al*, 2001; Klamt *et al*, 2001).

1.3 Radicais livres e a sepse

Como outras doenças inflamatórias, a sepse também tem nos ERO um forte componente, tanto no estabelecimento, na sua progressão e no estabelecimento do desfecho da doença.

A fagocitose dos patógenos pelo sistema imune e a ação citolítica destas células promove a liberação de ERO. A mobilização do sistema imune e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNFalfa, IL1 e IL6, promovem a produção de radicais livres sistemicamente.

Agentes vasoconstritores, como a adrenalina, sofrem oxidação pelo superóxido e perdem seus efeitos, contribuindo para o estabelecimento do quadro de choque séptico. Ainda, ERO participam do quadro de coagulopatias em microvasos, contribuindo para o quadro de falência de órgãos (Macarthur *et al*, 2000).

Além desses efeitos extracelulares, as ERO também agem como sinais intracelulares. Podem promover sinalização através da ativação do fator de transcrição NFkappaB, conhecido por transcrever genes pró-inflamatórios. Ainda, as ERO podem promover a liberação de fatores pró-apoptóticos a partir da mitocôndria, como o citocromo c, necessário para ativação da caspase-3.

Todos esses efeitos contribuem para o quadro inflamatório que se estabelece na sepse, e colaboram para a progressão nas suas formas mais graves, promovendo coagulopatias, danos celulares, falências de órgãos e culminando com a morte do indivíduo.

Nosso grupo determinou previamente que há um aumento na produção de superóxido mitocondrial e danos oxidativos em biomoléculas de órgãos de ratos submetidos a CLP (Ritter *et al*, 2003). Análises no plasma revelaram que a SOD se apresentava elevada após logo após a CLP (3 horas) e era um importante marcador de mortalidade.

Ainda, ao associarmos um tratamento antioxidante ao tratamento convencional (antibióticos e reposição de fluídos) conseguimos aumentar em 30% a sobrevivência, quando comparamos ao tratamento convencional. Este tratamento antioxidante combina uma quelante de metais (deferoxamina) amplamente utilizado no tratamento de hemocromatose (níveis elevados de ferro livre circulante) e um agente redutor (N-acetilcisteína) (Ritter *et al*, 2004).

2. OBJETIVOS DO TRABALHO

1. Avaliar as atividades da SOD e CAT em ratos Wistar submetidos a sepse não-letal e a sepse letal;
2. Avaliar se há um desequilíbrio entre as enzimas de produção de peróxido de hidrogênio (SOD) e as consumidoras de peróxido de hidrogênio (CAT), nas duas severidades da sepse;
3. Avaliar danos em biomoléculas nas duas severidades da sepse (letal e não-letal), comparando-as.
4. Avaliar a correlação entre os danos encontrados em biomoléculas e a relação entre as atividades das enzimas SOD e CAT;
5. Avaliar se o dano em biomoléculas está associado com falências de órgãos e com a severidade da sepse.

PARTE II

CAPÍTULO 1

Oxidative parameters differences during non-lethal and lethal sepsis development.

Artigo publicado no periódico Journal of Surgical Research volume 125(1), página 68, 2005.

Autores: Michael Andrades, Cristiane Ritter, José Cláudio Fonseca Moreira, Felipe Dal-Pizzol.

Oxidative Parameters Differences during *Non-Lethal* and *Lethal* Sepsis Development¹

Michael Andrades, M.Sc.,* Cristiane Ritter, M.D., M.Sc.,*† José Cláudio F. Moreira, Ph.D.,*
and Felipe Dal-Pizzol, M.D., Ph.D.*†,2

*Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; †Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Brazil

Submitted for publication August 9, 2004

Background. The participation of oxidative stress in the development of sepsis is still unclear. The aim of this study was to determine which aspect of antioxidant/pro-oxidant has the major importance in differentiation between non-lethal and lethal sepsis.

Materials and methods. Non-lethal and lethal sepsis were induced by cecal ligation and puncture (CLP) in adult Wistar rats, using 18 and 14 gauge needle, respectively. Rats were sacrificed within 12, 24, 48, and 96 h and organs (heart, lung, diaphragm, liver, and kidney) were isolated. The main antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were measured, as well as protein carbonyls and TBARS, as an index of oxidative damage.

Results. Twelve hours after lethal sepsis induction we observed an increase in the oxidative damage in all of the organs studied. In contrast, during non-lethal sepsis, the oxidative damage occurs late in the course of the disease (after 48 h) and the increase in protein carbonyls is of less magnitude when compared to the lethal sepsis. During non-lethal sepsis, in contrast to the lethal sepsis, there is no sustained increase in the SOD/CAT relation.

Conclusions. The present study is the first report showing a different profile of oxidative damage when comparing non-lethal and lethal sepsis. The oxidative damage in proteins seems to be a differential parameter between non-lethal and lethal sepsis. In addition, the SOD/CAT imbalance seems to be an important factor in the oxidative stress during the lethal sepsis, but seems not to happen, in a sustained way, during the non-lethal sepsis. © 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

¹ This work was supported by grants from CNPq and FUNCITEC.

² To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Avenida Universitária, 1105, Criciúma, SC, Brazil 88006-000. E-mail: piz@unesc.rct-sc.br.

Key Words: non-lethal sepsis; lethal sepsis; oxidative stress; CLP; free radicals; carbonyl.

INTRODUCTION

Sepsis and related syndromes, as the multiple organs dysfunction (MODS) are the most frequent causes of morbidity and mortality in intensive care units. Some of the postulated molecular mechanisms of sepsis generation and its progression are linked with the imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and its degradation by cellular antioxidants pathways [1–4] and many of these results has provided support to new treatment approaches [4, 5].

The pro-inflammatory effects of the ROS include endothelial damage, formation of chemotactic factors, neutrophils recruitment, TNF and IL-1 release, mitochondrial impairment and consequent DNA damage, lipid and protein oxidation [1, 2, 6]. The lipid and protein oxidation can produce intermediary molecules such as the 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), malonyldialdehyde (MDA), and glyoxal that can, in turn, attack protein residues such as lysine, arginine, and histidine resulting in covalent modification, commonly referred as Advanced Glication End-Product (AGE) or Advanced Lipoxidation End-Product (ALE) [7–9].

Despite the great efforts expended, the causes of oxidant-antioxidant imbalance in sepsis are still unclear. We had previously described, in a well-established model of lethal sepsis, that there is an imbalance between antioxidant enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) that is followed by oxidative damage in the major organ-target systems (lung, diaphragm, heart, liver, and kidney) [10]. In addition, we had demonstrated that the use of antioxidants was able to diminishes the oxidative damage and improve the survival in rats submitted to sepsis [5].

Instead of these, there are no systematic *studies to compare* oxidative parameters in different severities of sepsis. Thus, to clarify which aspect of the antioxidant imbalance and its oxidative consequences participate in the sepsis progression we performed an animal model of non-lethal sepsis and compared to the lethal sepsis.

MATERIALS AND METHODS

In vivo studies were performed in accordance with the National Institutes of Health guidelines and with the approval of the local ethics committee.

Cecal Ligation Puncture (CLP) Model

Male Wistar rats 2- to 3-months-old, subjected to the CLP procedure with fluid resuscitation as previously described [11, 12] were used in this study. Briefly, under aseptic conditions, a 3-cm midline laparotomy was performed to allow exposure of the cecum. The cecum was tightly ligated with a 3.0 silk suture at its base, below the ileocecal valve, and was perforated with a 18-gauge needle (non-lethal sepsis, mortality less than 5%, 10 days after CLP) or with a 14-gauge needle (lethal sepsis, mortality around 90%, 10 days after CLP). The cecum was then gently squeezed to extrude a small amount of feces from the perforation site. A sham operation (laparotomy and cecal exposure without any more manipulation) was performed as control. The animals were resuscitated with normal saline (30 ml/kg subcutaneous) immediately after and 12 h after the CLP.

In the lethal sepsis ten septic animals and ten controls were sacrificed 12 h after CLP and the organ systems (heart, lung, diaphragm, liver, and kidney) were isolated for posterior analyses. In this group we observed a high mortality rate after 12 h that difficult analyses in longer times after the sepsis induction. In the non-lethal sepsis, 12, 24, 48, and 96 h after CLP, 10 septic animals and 10 controls were sacrificed and the organ systems (heart, lung, diaphragm, liver, and kidney) were isolated for posterior analyses.

Measurement of Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS)

As an index of the lipid peroxidation we used the formation of TBARS during an acid-heating reaction as previously described [13]. Briefly, the samples (200 μ l) were mixed with trichloroacetic acid 10% (400 μ l) and centrifuged 10 min (4000 \times g) and the supernatant was mixed with equal volume of thiobarbituric acid 0.67%, then heated in a boiling water bath for 15 min. The TBARS were determined by the absorbency at 535 nm.

Measurement of Protein Carbonyls

The oxidative damage to the proteins was assessed by the determination of the carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH) as previously described [14]. Briefly, the proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and redissolved in DNPH and the absorbency read at 370 nm.

Measurement of CAT and SOD Activity

To determine the CAT activity the organ systems were sonicated in 50-mm phosphate buffer and the resulting suspension was centrifuged at 3000 \times g for 10 min. The supernatant was used to the enzymatic assay. The CAT activity was measured by the rate of decrease in the hydrogen peroxide absorbency at 240 nm [15]. The SOD activity was assayed by measuring the inhibition of the adrenaline auto-oxidation, as previously described [16].

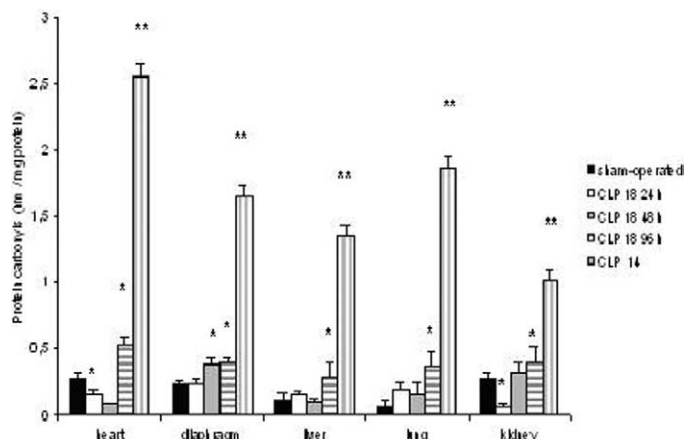


FIG. 1. Protein carbonyls content during non-lethal or lethal sepsis. Rats were sham-operated or submitted to CLP with a 18-gauge needle (non-lethal sepsis) or with a 14-gauge needle (lethal sepsis). In lethal sepsis animals were sacrificed 12 h after CLP and in non-lethal sepsis, 12, 24, 48, and 96 h. After these times the heart, diaphragm, liver, lung, and kidney were removed to the determination of protein carbonyls content as described in the Material and Methods section. Values are expressed as means \pm SD [$n = 10$ each group; * different from sham-operated ($P < 0.05$), ** different from CLP18 ($P < 0.05$)].

Statistical Analysis

Results are expressed as means and P values were considered significant when $P < 0.05$. Differences in the experimental groups were determined by ANOVA. Comparison between means was carried out using a Newman-Keuls test.

RESULTS

Oxidative Damage Parameters after Non-Lethal or Lethal Sepsis Induction

In all of the organs analyzed, the lethal sepsis was associated with an increase in the carbonyl levels 12 h after the CLP (Fig. 1). In contrast, the oxidative damage to the proteins occurs only 48 to 96 h after the CLP in the non-lethal sepsis, and is of less magnitude when compared to the lethal sepsis (Fig. 1). Surprisingly, the heart and the kidney presented lower carbonyl levels 24 h after the CLP in comparison to the control (Fig. 1). The carbonyl levels 12-h after the septic challenge was similar to the control group in the non-lethal sepsis group (data not shown).

As demonstrated for the carbonyl levels, in the lethal sepsis we demonstrated oxidative lipid damage 12 h after the CLP (Fig. 2). An increase in the TBARS was only evident 48 h after the CLP in the non-lethal sepsis (Fig. 2). Differently from carbonyls, the magnitude of lipid peroxidation was similar when compared the lethal and the non-lethal sepsis. The TBARS levels 12 h after the septic challenge was similar to the control in all organs in the non-lethal sepsis (data not shown).

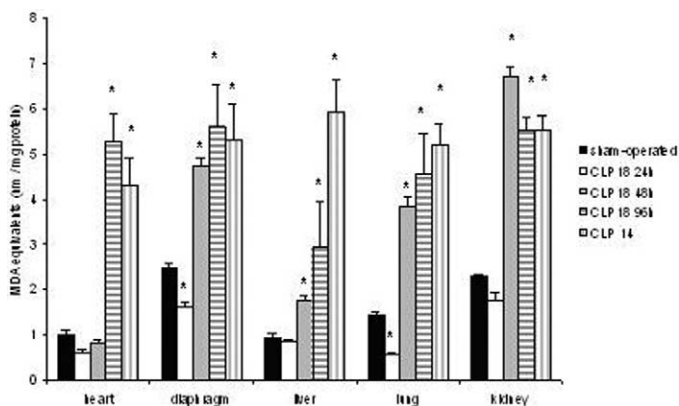


FIG. 2. Thiobarbituric acid reactive species content during non-lethal or lethal sepsis. Rats were sham-operated or submitted to CLP with a 18-gauge needle (non-lethal sepsis) or with a 14-gauge needle (lethal sepsis). In lethal sepsis animals were sacrificed 12 h after CLP and in non-lethal sepsis, 12, 24, 48, and 96 h. After these times the heart, diaphragm, liver, lung, and kidney were removed to the determination of thiobarbituric acid reactive species content as described in the Material and Methods section. Values are expressed as means \pm SD [$n = 10$ each group; * different from sham-operated ($P < 0.05$)].

SOD and CAT Activities after Sepsis Induction

The regulation of the antioxidant enzymes seems to be important to hold the balance between the ROS generation and its consumption. The balance between H_2O_2 production by SOD and its degradation by catalase is very important to avoid hydroxyl generation by the Fenton chemistry [17, 18]. The imbalance of these enzymes could be related to the occurrence of cell damage during the lethal sepsis, and this imbalance could be evidenced by the determination of the SOD/CAT relation [10]. Twelve hours after sepsis induction, the SOD/CAT relation was significantly increased in the majority of organs in the lethal sepsis (Fig. 3). In contrast, during the non-lethal sepsis we observed an increase in the SOD/CAT relation in the heart (after 24 h), the lung (only 24 h after CLP) and the kidney (only 96 h after CLP) (Fig. 3). In none of these organs the increase was in the same magnitude when compared to the lethal sepsis. The SOD/CAT relation 12 h after the septic challenge was similar to the control in all of the organs in the non-lethal sepsis (data not shown).

DISCUSSION

The close relationship between free radicals and sepsis has been described a long time [1–4] but there are no studies to compare oxidative parameters in non-lethal and lethal sepsis. We had previously demonstrated in a model of lethal sepsis that the free radical production and the oxidative damage is particular to the organ studied and occurs early (within 12 h) in the course of disease [10]. In the present work we demon-

strated that the oxidative damage occurs late (after 24 h) in a model of non-lethal sepsis in all of the organs studied (Fig. 1 and 2). Despite the significant increase in the protein carbonyls within 48 h in the non-lethal sepsis group this increase did not occur in the same extent when compared to the lethal sepsis group (Fig. 1). Curiously, in the non-lethal sepsis the TBARS also increased lately (after 48 h) but reach the same levels than the lethal sepsis (Fig. 2). These results suggested that the time, but not the magnitude of lipid peroxidation, and that the time and the magnitude of protein oxidation is related to severity in the CLP model, being an important clue to design new treatment strategies for sepsis.

Both the TBARS and the protein carbonyls are able to generate AGEs or ALEs and each of these products can act in membrane receptors, triggering some intracellular signaling cascade. Kirkham *et al.* have demonstrated that the extracellular matrix proteins oxidized with 4-HNE, acrolein or cigarette smoke condensate had different effects in the impairment of macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils, independently of other pro-inflammatory stimuli [19]. Macrophages cultivated in oxidized collagen IV or bovine serum albumin (BSA) basement showed poor phagocytic and killing activity and increased CCL2/MCP-1 release [19]. In addition, pretreatment with fucoidan, a known type A Scavenger Receptor (SRA) ligand, prevented macrophage adhesion in acrolein modified collagen IV basement but not in 4-HNE modified collagen IV basement [20]. As cumulative oxidative damage occurs along with the acute and the chronic inflammatory diseases [19–22] we could suppose that the macrophage adhesion and retention is a common fate to these diseases as well as the AGE and ALE generation.

The macrophages display a wide variety of phenotypes depending on the cytokine environment, tissue localization and inflammatory process. In the event of infection resident macrophages are activated through engagement of the Toll-like receptors or interferons (IFN) binding [23]. Classically Activated Macrophages (CAM) are involved in the destruction of intracellular pathogens and often are regulated by Th1 cells or $CD8^+$ cells through IFN- γ production. These macrophages are characterized by typical pro-inflammatory cytokines production (IL-1, IL-6, TNF, and INF), increased respiratory burst, nitric oxide production, and phagocytic/killing activity [23]. Recently it has become recognized that the macrophages also can be activated by an alternative pathway involving the Th2 cytokines IL-4 and IL-13 yielding Alternative Activated Macrophages (AAM) [23]. In contrast to CAM, the alternative activation causes CCL2/MCP-1 and CCL17/TARC release, decreased nitric oxide production and compromised phagocytic/killing activity. Because the Th2 cytokines are able to suppress transcriptional activation

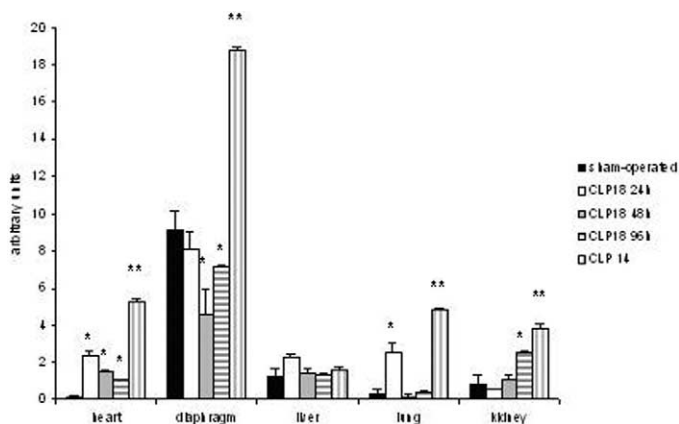


FIG. 3. SOD/CAT relation in major organs during non-lethal or lethal sepsis. Rats were sham-operated or submitted to cecal ligation and puncture (CLP) with a 18-gauge needle (non-lethal sepsis) or with a 14-gauge needle (lethal sepsis). In lethal sepsis animals were sacrificed 12 h after CLP and in non-lethal sepsis, 12, 24, 48, and 96 h. After these times the heart, diaphragm, liver, lung, and kidney were removed to the determination of SOD and CAT activities as described under in the Material and Methods section. Values are expressed as means \pm SD [$n = 10$ each group; * different from sham-operated ($P < 0.05$). ** different from CLP18 ($P < 0.05$)].

of IFN- γ and LPS-responsive genes in macrophages, CAM are not generated in circumstances where AAM predominate [23].

In this regard and based on the fact that macrophages cultured in acrolein modified collagen IV basement produce increased levels of CCL2/MCP-1, a typical AAM chemokine [19], we could suggest that in lethal sepsis the higher increase in protein carbonyls, but not TBARS, when compared to non-lethal sepsis could in part interfere with immune response. These differences could trigger the activation of alternative activated macrophages that could be related to sepsis severity [24]. Further studies will address this specifically issue.

Once the non-lethal and the lethal sepsis presented differences in the oxidative damage, we determined the SOD/CAT ratio. SOD is an enzyme that uses the superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) as substrate and produce hydrogen peroxyde (H_2O_2). This molecule is a substrate to the peroxidases, being the CAT the most important peroxidase in the organs studied in this work. In situations of SOD over activation without an compensatory increase in the peroxidases, the excess of the H_2O_2 could react with metal ions, via the Fenton chemistry, and generate hydroxyl radicals ($\cdot OH$) that is thought the most dangerous radical [17]. As we had previously demonstrated an increase in the SOD/CAT ratio in a rat model of lethal sepsis [10], in this study we aimed to verify if this imbalance is present in the non-lethal sepsis. As we demonstrated in Fig. 3, only the heart, and in lesser extent the lung and the kidney, presented an increase in the SOD/CAT ratio. This imbalance verified in the lethal sepsis is dependent of SOD over-

activation [10] and could be related to the fact that peritoneal and plasmatic levels of IL1, TNF, and LPS increase in accordance with increase of needle puncture [11, 25]. These mediators are well known stimulatory signals to MnSOD gene transcription [25, 27].

In this work, we showed that imbalance between SOD and CAT occurs more consistently in the lethal sepsis and this could induces oxidative stress and increases levels of protein carbonyls when compared to the non-lethal sepsis, and it seems that this is an important key in the understanding of sepsis progression.

REFERENCES

- Goode, H. F., Cowley, H. C., Walker, B. E., Howdle, P. D., and Webster, N. R. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ disfunction. *Crit. Care Med.* **23**: 646, 1995.
- Borrelli, E., Roux-Lombard, P., Grau, G. E., *et al.* Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Crit. Care Med.* **24**: 392, 1996.
- Winterbourn, C. C., Buss, H., Chan, T. P., Plank, L. D., Clark, M. A., and Windsor, J. A. Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Crit. Care Med.* **28**: 143, 2000.
- Macarthur, H., Westfall, T. C., Riley, D. P., Misko, T. P., and Salvemini, D. Inactivation of catecholamine by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 9753, 2000.
- Ritter, C., Andrades, M. E., Reinke, A., Menna-Barreto, S., Moreira, J. C. F., and Dal-Pizzol, F. Treatment with N-Acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves mortality in sepsis. *Crit. Care Med.* **32**: 342, 2004.
- Htchkiss, R. S., and Karls, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.* **348**: 138, 2003.
- Dean, R. T., Shanlin, F. U., Stocker, R., and Davies, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* **324**: 1, 1997.
- Uchida, K., Kanematsu, M., Sakai, K., *et al.* Protein-bound acrolein: Potential markers for oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4882, 1998.
- Refsgaard, H. H. F., Tsai, L., and Stadtman, E. R. Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 611, 2000.
- Ritter, C., Andrades, M., Frota M. L., Jr., *et al.* Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Intensive Care Med.* **29**: 1782, 2003.
- Wichterman, K. A., Baue, A. E., and Chaudry, I. H. Sepsis and septic shock: A review of laboratory models and a proposal. *J. Surg. Res.* **29**: 189, 1980.
- Hollenberg, S. M., Dumasius, A., Easington, C., Colilla, S. A., Neumann, A., and Parrillo, J. E. Characterization of a hyperdynamic murine model of resuscitated sepsis using echocardiography. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**: 891, 2001.
- Draper, H. H., and Hadley, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **186**: 421, 1990.
- Levine, R. L., Garland, D., and Oliver, C. N. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **186**: 464, 1990.

15. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**: 121, 1984.
16. Bannister, J. V., and Calabrese, L. Assays for SOD. *Methods Biochem. Anal.* **32**: 279, 1987.
17. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford Science Publications, 1999.
18. Lortz, S., and Tiedge, M. Sequential inactivation of reactive oxygen species by combined overexpression of SOD isoforms and catalase in insulin-producing cells. *Free Rad. Biol. Med.* **34**: 683, 2003.
19. Kirkham, P. A., Spooner, G., Ffoulkes-Jones, C., and Calvez, R. Cigarette smoke triggers macrophage adhesion and activation: Role of lipid peroxidation products and scavenger receptor. *Free Rad. Biol. Med.* **35**: 697, 2003.
20. Kirkham, P. A., Spooner, G., Rahman, I., and Rossi, A. G. Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils in compromised by matrix proteins modified by cigarette smoke and lipid peroxidation products. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **318**: 32, 2004.
21. Pinho, R. A., Bonatto, F., Andrades, M., *et al.* Lung oxidative response after acute coal dust exposure. *Environ. Res.* **96**: 290–297, 2004.
22. Uchida, K. Current status of acrolein as a lipid peroxidation Product. *Trend. Cardiovasc. Med.* **9**: 109, 1999.
23. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 23, 2003.
24. Dal-Pizzol, F. Alternative activated macrophage: A new key for systemic inflammatory response syndrome and sepsis treatment? *Crit. Care Med.* **32**: 1971, 2004.
25. Ebong, S., Call, D., Nemzek, J., Bolgos, G., Newcomb, D., and Remick, D. Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect. Immun.* **67**: 6603, 1999.
26. Visner, G. A., Dougall, W. C., Wilson, J. M., Burr, I. A., and Nick, H. S. Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J. Biol. Chem.* **265**: 2856, 1990.
27. Masuda, A., Longo, D. L., Kobayashi, Y., *et al.* Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase by interleukin 1. *FASEB J.* **2**: 3087, 1988.

CAPÍTULO 2

Artigo a ser submetido para o periódico Shock.

**Effect of Superoxide dismutase/Catalase ratio over oxidative damage and organ failure
in septic rats**

Michael Andrades^{*}, Cristiane Ritter^{*,#}, Roberto Bernardi[#], Marcos Roberto de Oliveira^{*}, José Cláudio Fonseca Moreira^{*}, Felipe Dal-Pizzol^{*,#,1}

^{*}Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

[#]Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil

¹To whom correspondence and reprints requests should be addressed at Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Avenida Universitária, 1105, Criciúma, SC, Brazil 88006-000. E-mail: piz@unesc.rct-sc.br

Running head: SOD/CAT ratio, oxidative damage and organ failure

ABSTRACT

There are several evidences that free radicals participate in the onset of sepsis as well as contribute to its progression into shock and severe sepsis. The main enzymatic system engaged in the antioxidant defense is the superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Beside this coupled activity the organisms have non-enzymatic antioxidants, which are depleted in septic patients. These findings encourage researchers to develop antioxidant therapy. N-acetylcysteine (NAC) is the main precursor in glutathione synthesis and has an intrinsic antioxidant value, due to its reduced thiol extremity. Deferoxamine (DFX) is an iron chelator and can prevent metal-mediated oxidative damage. The association between these two compounds is effective in reducing mortality in clinically relevant model of sepsis - cecal ligation and puncture (CLP). In this work we show that SOD/CAT ratio was increased in CLP animal and presented a strong correlation with lipid oxidative damage index (TBARS) in lung and diaphragm but a weak correlation in kidney. The antioxidant treatment (NAC+DFX) was able in reducing both the SOD/CAT ratio and the correlation coefficient. The association between SOD/CAT ratio, oxidative damage and organ failure was further evaluated. TBARS and SOD/CAT ratio decrease with antibiotic therapy (BS) and with BS plus NAC+DFX. Protein in bronchoalveolar fluid lavage (BALF), an index of pulmonary vascular permeability, and plasmatic urea, an index of kidney failure, presented highly positive correlation with both TBARS and SOD/CAT ratio. In addition, we show that antioxidant treatment prevented organ failure. Taken together these findings suggest the importance of SOD/CAT ratio in sepsis, mainly due its consequences mainly over the lung. Moreover, this work helps to elucidate the way by which NAC+DFX exert its effects.

KEY WORDS: urea, BALF, free radical, TBARS, CLP

INTRODUCTION

Sepsis and related syndromes, as the multiple organs dysfunction (MODS) are the most frequent causes of morbidity and mortality in intensive care units, contributing to 750,000 cases per year with an average mortality of 29% (1). It is a complex syndrome characterized by an imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory response to pathogen (2). Some of the postulated molecular mechanisms of sepsis generation and its progression are linked with the imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and its degradation by cellular antioxidants pathways (3-7). This imbalance has provided support to new treatment approaches (5,8). The pro-inflammatory effects of ROS include endothelial damage, formation of chemotatic factors, neutrophil recruitment, TNF and IL-1 release, mitochondrial impairment and consequent DNA damage, lipid and protein oxidation (2,6,7). Despite the great efforts expended, the causes of oxidant-antioxidant imbalance in sepsis are still unclear. We have previously described that there was an imbalance between antioxidant enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) that was followed by oxidative damage in the major organ-target systems (lung, diaphragm, heart, liver, and kidney) after sepsis induction (9,10). In addition, we have demonstrated that the use of antioxidants was able to diminish the oxidative damage and improve survival in septic rats (8). To date there are few direct evidences showing a correlation between organ failure and oxidative damage in target organs during sepsis development. In this work we attempt to verify whether there is correlation between oxidative damage and SOD/CAT relation in the main organ systems involved in sepsis. Further, in order to clarify the link between oxidative damage and organ failure we analyzed the correlation between oxidative damage and plasmatic markers of organ dysfunction.

Materials and Methods

In vivo studies were performed in accordance with the National Institutes of Health guidelines and with the approval of the local ethics committee.

Cecal Ligation Puncture (CLP) model

Male Wistar rats 2- to 3-months-old, subjected to the CLP procedure with fluid resuscitation as previously described (11,12) were used in this study. Briefly, under aseptic conditions, a 3-cm midline laparotomy was performed to allow exposure of the cecum. The cecum was tightly ligated with a 3.0 silk suture at its base, below the ileocecal valve, and was perforated with a 18-gauge needle (non-lethal sepsis, mortality less than 5%, 10 days after CLP) or with a 14-gauge needle (lethal sepsis, mortality around 90%, 10 days after CLP). The cecum was then gently squeezed to extrude a small amount of feces from the perforation site. A sham operation (laparotomy and cecal exposure without any more manipulation) was performed as control. The animals were resuscitated with normal saline (30 mL/kg subcutaneous) immediately after and 12 h after the CLP. In the lethal sepsis sixteen septic animals and sixteen controls were sacrificed 12 h after CLP and the organ systems (heart, lung, diaphragm, liver, and kidney) were isolated for posterior analyses. In this group we observed a high mortality rate after 12 h that difficult analyses in longer times after the sepsis induction. In the non-lethal sepsis, eight septic animals and eight control animals were sacrificed 48 h after CLP (this time was chosen since previous studies from our laboratory demonstrated that at this time all organs analyzed had increase in oxidative stress markers, see ref. 10). The organs (heart, lung, diaphragm, liver, and kidney) were isolated for posterior analyses.

Treatment protocols

To access parameters in lethal sepsis, as well as the effect of treatments the animals were divided into three groups: CLP – rats were submitted to CLP without any further treatment; BS – animals received ceftriaxone 30 mg/kg and clindamycin 25 mg/kg every 6 h with subcutaneous injection; ATX – rats received NAC (20 mg/kg) 3 h, 6 h, and 12 h after CLP plus DFX (20 mg/kg) 3 h after CLP with a subcutaneous injection in addition of basic support.

Measurement of Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS)

As an index of the lipid peroxidation we used the formation of TBARS during an acid-heating reaction as previously described (11). Briefly, the samples (200 μ L) were mixed with trichloroacetic acid 10% (400 μ L) and centrifuged 10 min (4000 \times *g*) and the supernatant was mixed with equal volume of thiobarbituric acid 0.67%. This system was heated in a boiling water bath for 15 min and the TBARS were determined by the absorbance at 535 nm.

Measurement of CAT, SOD and glutathione peroxidase (GPx) activities

To determine the CAT activity the organ systems were sonicated in 50 mM phosphate buffer and the resulting suspension was centrifuged at 3000 \times *g* for 10 min. The supernatant was used to the enzymatic assay. The CAT activity was measured by the rate of decrease in the hydrogen peroxide absorbance at 240 nm (14). The SOD activity was assayed by measuring the inhibition of the adrenaline auto-oxidation, as previously described (15). To determine GPx activity organs homogenate were added in a 1 mL final volume system containing Glutathione reductase followed at 340nm for 8 minutes (16).

Organ failure markers

As an index of lung alveolo-capillary dysfunction we accessed protein content in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) (17). Briefly, twelve hours after sepsis induction animals were killed and bronchoalveolar lavage was performed. BALF was collected three times after instillation and withdrawn with 6 mL of phosphate-buffered saline. We always retrieved approximately 15 mL of BAL administered (n = 8 rats to each group). Protein content in BALF was measured by Lowry assay and results are expressed as mg/mL. As an index of kidney failure we accessed plasmatic urea (n = 8 rats to each group). Urea was determined routinely by commercially available kits (Labtest, Brazil).

Statistical analysis

Data was analyzed by 1-way ANOVA and multiple comparisons were performed by a Newman-Keuls test. Pearson's correlation test was used to study associations between the variables. Statistical significance was considered when $P < 0.05$.

RESULTS

SOD/CAT ratio and GPx activity in lethal sepsis

We found a significant increase in SOD and CAT ratio after CLP. Treatment with BS was not able to abolish this imbalance (Figure 1A). In contrast, SOD/CAT ratio returned to control levels after ATX treatment (figure 1A). To verify whether other antioxidant enzyme was compensating the imbalance verified between SOD and CAT, we determined glutathione peroxidase activity. This enzyme reduces H_2O_2 into water using the tripeptide glutathione as electron donor (16). As showed in figure 1B nor sepsis neither treatment caused any alterations in GPx activity.

SOD/CAT ratio and TBARS levels

As showed in figure 2, a highly positive correlation between SOD/CAT ratio and TBARS levels was found in the lung and diaphragm from animals submitted to lethal sepsis. In addition, we found a weak correlation in the kidney (figure 2C). When animals received ATX treatment the correlation between SOD/CAT ratio and TBARS levels was abolished in these organs. Organs from animal submitted to non-lethal sepsis did not show correlation between these two variables. In addition, we did not detect any correlation between SOD/CAT ratio and TBARS levels in the heart and liver (data not shown).

Organ failure and TBARS levels in lethal sepsis

Organ failure is associated with worse prognosis in sepsis. In figure 3 we showed that lethal sepsis caused a serious impairment in kidney and lung function, which can be avoided with ATX treatment (355 mg/dL in CLP vs. 235 md/dL in ATX group and 96.6 mg/mL of protein in BALF from CLP vs. 56.25 mg/mL of protein in BALF from ATX group, $P < 0.001$).

In figure 3A and 3B we show a decrease in organ failure markers along with TBARS levels in organs homogenates. When we analyzed organs from rats that did not receive any treatment (Lethal sepsis group), we also found a direct correlation between TBARS in lung and protein content in BALF ($R = 0.54$, $P < 0.05$) (figure 3A). However, we found a inverse correlation between kidney parameters ($R = - 0.95$, $P < 0.01$) (figure 3B). In spite of this, ATX treatment could abolish these correlations in both organs. We could not demonstrated correlation between plasmatic AST and liver TBARS (data not shown).

Organ failure and SOD/CAT ratio

SOD/CAT ratio was measured in lung and kidney homogenates and displayed strong positive correlation with protein content in BALF (figure 4A) and with plasmatic urea (figure 4B). However, when groups (Lethal sepsis, BS and ATX) were separately analyzed we did

not find significant correlation between SOD/CAT ratio in kidney and plasmatic urea in lethal sepsis group (figure 4B).

DISCUSSION

Several works have associate free radicals and sepsis development (4-6). Recently, our group have systematically characterized ROS alterations in CLP model of sepsis (10), a well established model of polimicrobial sepsis that closely mimics the human disease of ruptured appendicitis or perforated diverticulitis (18,19). Despite the growing evidences that ROS are important during sepsis development and its potential as therapeutic target, there is lack of evidences supporting the actual role of ROS in organ dysfunction. In this work we attempt to verify whether organ failure seen in CLP model of sepsis is associated with oxidative damage in main organ systems involved in sepsis development.

Previous works have identified an increase in superoxide radical production during the sepsis development. The main sources of superoxide are the NADPH oxidase system (20,21), xanthine oxireductase (22) and impairment in mitochondrial electron transport chain (9). Besides non-enzymatic systems, SOD and CAT are the major enzymatic system responsible in protecting cell against free radicals attacks (23). SOD is an enzyme able in reducing the superoxide radical into hydrogen peroxide (H_2O_2) which is the substrate to CAT and GPx. When cell has increased levels of SOD without a proportional increase in peroxidases, cells face a peroxide overload challenge. Peroxide can react with transitional metals and generate the radical hydroxyl, which is the most harmful radical (23). This was well demonstrated by SOD, CAT gene transfections (24,25) as well as in *ex vivo* models, which demonstrated a bell-shaped effect of SOD activity (26,27). These results suggest that the overexpression of SOD without a compensatory increase in CAT has deleterious effects upon the cell.

We previously detected a mild or no imbalance between SOD and CAT activities after induction of non-lethal sepsis (10). Here we show an imbalance between SOD and CAT 12 hours after induction of lethal sepsis (figure 1A). This imbalance could be attributed to two events: 1) In CLP sepsis model there is an increased level of peritoneal and plasmatic IL1, TNF and LPS (11,28), which are known pro-inflammatory molecules that increase SOD mRNA (29,30); 2) CAT activity can be inhibited by superoxide produced in large amounts in sepsis (31). Moreover GPx was not modulated by sepsis (figure 1B), thus GPx did not provide compensatory peroxidase activity.

In present study we verified that SOD/CAT ratio is correlated with oxidative damage seen in worsening of sepsis in lung, diaphragm and kidney (figure 2). These correlation were efficiently abolished by ATX treatment in all organs. Non-lethal sepsis did not present significant correlation and the likely cause of this lack of association in non-lethal sepsis lies in its preserved non-enzymatic defenses. This suggestion is reinforced by the lost of correlation in organs from animals submitted to antioxidant treatment (figure 2). Indeed some works have found decreased levels of these non-enzymatic antioxidants such as vitamine C and E, retinol, lycopene and betacarotene (6,7,32) in plasma from patients with sepsis and multiple organ failure (MOF) but not in plasma from critical ill patients without risk for development of MOF (6).

In addition, we did not find any correlation between SOD/CAT ratio and oxidative damage in liver and heart (data not shown). We suggest that this correlation would happen in different times to each organ, being lung and kidney the most dependent on the SOD/CAT coupled activity to maintain homeostasis. Other works have demonstrated that organs respond differently to sepsis challenge and this response may depend on its particular physiology, vascularization and antioxidant defenses (8,9,33).

Oxidative damage was already identified in animal model of sepsis, as well as in septic patients (4,6,9) but no one presented evidences that oxidative damage and organ failure are intertwined events. Here we presented data linking these two events at least in lung and kidney (figure 3) since our data do not support the same for the liver and heart (data not shown). ATX treatment was able to abolish this correlation in both organs. We have already demonstrated increase in TBARS levels, oxidative protein damage and superoxide production in these organs (9) as well as a decrease in these parameters when rats were treated with NAC+DFX (8).

When correlation analysis was made to each treatment group we found positive correlation between protein in BALF and TBARS (figure 3A) but a negative correlation between plasmatic urea and TBARS (figure 3B). The ATX treatment was able in abolish this correlation in both organs. Therefore, it seems that TBARS is concerned with lung failure rather than with kidney failure, at least within 12 hours after CLP. Again, we suggest that biochemical and physiological peculiarity of each organ may be responsible by these finding. Indeed, acute renal failure is an earlier event in the onset of shock and contributes significantly to pulmonary edema and acute respiratory distress syndrome (34,35).

As the SOD/CAT ratio and TBARS are intertwined events we decided to verify whether this enzymatic balance has link with organ failure. Both lung and kidney failure presented positive correlation with SOD/CAT ratio in the worsening of sepsis (figure 4), suggesting that the imbalance between these two enzymes could promote oxidative damage and eventually organ failure.

Besides these important understandings in sepsis progression, we also determined another mechanism by which antioxidant treatment increases survival CLP sepsis. At least in lung and kidney the treatment provided efficient protective effects, since we found a decrease

in protein in BALF and plasmatic urea (355 mg/dL in CLP vs. 235 md/dL in ATX group and 96.6 mg/mL of protein in CLP vs. 56.25 mg/mL of protein in ATX group, $P<0.001$).

In conclusion, our data identified a relationship between SOD and CAT imbalance and TBARS levels in lung diaphragm, lung and kidney within 12 hours after the CLP. ATX treatment abolish this relationship, likely by replacing non-enzymatic antioxidants. We also identified a link between lipid damage and organ failure, which can be efficiently avoided by ATX treatment.

REFERENCES

1. 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* 29:1303-1310, 2001.
2. Hotchkiss RS, Karl IE: The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. *New Eng J Med* 348:138-150, 2003.
3. Salvemini D, Cuzzocrea S: Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med* 33:1173-1185, 2002.
4. Winterbourn CC, Buss IH, Chan TP, Plank LD, Clark MA, Windsor JA: Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Crit Care Med* 28:143-149, 2000.
5. Macarthur H, Westfall TC, Riley DP, Misko TP, Salvemini D: Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9753-9758, 2000.
6. Borrelli E, Roux-Lombard P, Grau GE, Girardin E, Ricou B, Dayer J, Suter PM: Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Crit Care Med* 24:392-397, 1996.
7. 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* 23:646-651, 1995.
8. 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* 32:342-39, 2004.
9. 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* 29:1782-1789, 2003.
10. Andrades M, Ritter C, Moreira JC, Dal-Pizzol F: Oxidative parameters differences during non-lethal and lethal sepsis development. *J Surg Res* 125:68-72, 2005.
11. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH: Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 29:189-20, 1980.
12. Hollenberg SM, Dumasius A, Easington C, Colilla SA, Neumann A, Parrillo JE: Characterization of a hyperdynamic murine model of resuscitated sepsis using echocardiography. *Am J Respir Crit Care Med* 164:891-895, 2001.
13. Draper HH, Hadley M: Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186:421-431, 1990.
- 14 Aebi H: Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105:121-126, 1984.
- 15 Bannister JV, Calabrese L: Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 32:279-312, 1987.
16. Flohe L, Günzler WA: Assays of Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105:114-121, 1984.
17. Ritter C, da Cunha AA, Echer IC, Andrades M, Reinke A, Lucchiari N, Rocha J, Streck EL, Menna-Barreto S, Moreira JCF, Dal-Pizzol F: Effects of N-acetylcysteine plus deferoxamine in lipopolysaccharide induced acute lung injury in the rat. *Crit Care Med*, article *in press*.
18. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M: Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov* 4:854-865, 2005.
19. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW 3rd, Bland KI, Chaudry IH: Cecal ligation and puncture. *Shock Suppl* 1:52-57, 2005.

20. Durant R, Klouche K, Delbosc S, Morena M, Amigues L, Beraud JJ, Canaud B, Cristol JP: Superoxide anion overproduction in sepsis: effects of vitamin e and simvastatin. *Shock* 22:34-39, 2004.
21. Javesghani D, Magder SA, Barreiro E, Quinn MT, Hussain SN: Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscles. *Am J Respir Crit Care Med* 165:412-418, 2002.
22. Hsu D, Liu M: Sesame oil attenuates multiple organ failure and increases survival rate during endotoxemia in rats. *Crit Care Med* 30:1859-1862, 2002.
23. Halliwell B, Gutteridge JM: *Free Radical in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, UK, 1999.
24. Fullerton HJ, Ditelberg JS, Chen SF, Sarco DP, Chan PH, Epstein CJ, Ferriero DM: Copper/zinc superoxide dismutase transgenic brain accumulates hydrogen peroxide after perinatal hypoxia ischemia. *Ann Neurol* 44:357-364, 1998.
25. Kelner MJ, Bagnell R, Montoya M, Estes L, Uglich SF, Cerutti P: Transfection with human copper-zinc superoxide dismutase induces bidirectional alterations in other antioxidant enzymes, proteins, growth factor response, and paraquat resistance. *Free Radic Biol Med* 18:497-506, 1995.
26. Omar BA, McCord JM: The cardioprotective effect of Mn-superoxide dismutase is lost at high doses in the postischemic isolated rabbit heart. *Free Radic Biol Med* 9:473-478, 1990.
27. Omar BA, Gad NM, Jordan MC, Striplin SP, Russell WJ, Downey JM, McCord JM: Cardioprotection by Cu,Zn-superoxide dismutase is lost at high doses in the reoxygenated heart. *Free Radic Biol Med* 9:465-471, 1990.
28. Ebong S, Call D, Nemzek J, Bolgos G, Newcomb D, Remick D: Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect Immun* 67:6603-6610, 1999.

29. Visner GA, Dougall WC, Wilson JM, Burr IA, Nick HS: Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J Biol Chem* 265:2856-2864, 1990.
30. Dougall WC, Nick HS: Manganese superoxide dismutase: a hepatic acute phase protein regulated by interleukin-6 and glucocorticoids. *Endocrinology* 129:2376-2384, 1991.
31. Kono Y, Fridovich I: Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 257:5751-5754, 1982.
32. Tsai K, Hsu T, Kong C, Lin K, Lu F: Is the endogenous peroxy-radical scavenging capacity of plasma protective in systemic inflammatory disorders in humans? *Free Radic Biol Med* 28:926-933, 2000.
33. Kajikawa O, Frevert CW, Lin SM, Goodman RB, Mongovin SM, Wong V, Ballman K, Daubeuf B, Elson G, Martin TR: Gene expression of Toll-like receptor-2, Toll-like receptor-4, and MD2 is differentially regulated in rabbits with *Escherichia coli* pneumonia. *Gene* 344:193-202, 2005.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 - SOD/CAT ratio (A) and GPx activity (B): Organs were isolated from lethal sepsis-induced (14-gauge needle) Wistar rats 12 hours after CLP. (A) SOD/CAT ratio was achieved dividing SOD activity by CAT activity (see details in Material and Methods) and is expressed in arbitrary units (n = 10 to each group) . (B) GPx activity (n = 10). Values are expressed as mean \pm SEM. * Difference from Sham and ATX group ($P < 0.05$).

Figure 2 – Correlation analyses between lipid oxidative damage (TBARS) and SOD/CAT ratio in lung (A), diaphragm (B) and kidney (C). Rats were divided in four groups: Lethal sepsis (square) - animal were submitted to CLP (14-gauge needle) (n = 16). Basic support (filled circle) - animals received ceftriaxone 30 mg/kg and clindamycin 25 mg/kg every 6 h with subcutaneous injection (n = 8). ATX (triangle) – animals received NAC (20 mg/kg) 3 h, 6 h, and 12 h after CLP plus DFX (20 mg/kg) 3 h after CLP with a subcutaneous injection in addition of basic support (n = 8). Non-lethal sepsis (open circle) – animals were submitted to CLP (18-gauge needle) (n = 8). All groups received fluid resuscitation immediately and 12 hours after CLP. Values are expressed as mean \pm SEM. Pearson's correlation test was used to study associations between the variables. Statistical significance was considered when $P < 0.05$.

Figure 3 – Correlation analyses between lung TBARS and protein in BALF (A) and between kidney TBARS and plasmatic urea (B). Rats were divided in three groups: Lethal sepsis (square) – animals were submitted to CLP (14-gauge needle). BS (basic support – triangle) - animals received ceftriaxone 30 mg/kg and clindamycin 25 mg/kg every 6 h with subcutaneous injection. ATX (circle) - animals received NAC (20 mg/kg) 3 h, 6 h, and 12 h after CLP plus DFX (20 mg/kg) 3 h after CLP with a subcutaneous injection in addition of

basic support (n = 8 in each group). All groups received fluid resuscitation immediately and 12 hours after CLP. Animals were sacrificed 12 hours after CLP and organs and blood were isolated for TBARS, BALF protein and urea measurement (see details in Materials and Methods). Values are expressed as mean \pm SEM. Pearson's correlation test was used to study associations between the variables. Statistical significance was considered when $P < 0.05$.

Figure 4 – Correlation analyses between SOD/CAT ratio in lung and protein in BALF

(A) and between SOD/CAT ratio in kidney and plasmatic urea (B). Rats were divided in three groups: Lethal sepsis (square) – animals were submitted to CLP (14-gauge needle). BS (basic support – triangle) - animals received ceftriaxone 30 mg/kg and clindamycin 25 mg/kg every 6 h with subcutaneous injection. ATX (circle) - animals received NAC (20 mg/kg) 3 h, 6 h, and 12 h after CLP plus DFX (20 mg/kg) 3 h after CLP with a subcutaneous injection in addition of basic support (n = 8 in each group). All groups received fluid resuscitation immediately and 12 hours after CLP. Animals were sacrificed 12 hours after CLP and organs and blood were isolated for SOD, CAT, BALF protein and urea measurement (see details in Materials and Methods). Values are expressed as mean \pm SEM. Pearson's correlation test was used to study associations between the variables. Statistical significance was considered when $P < 0.05$.

Figure 1

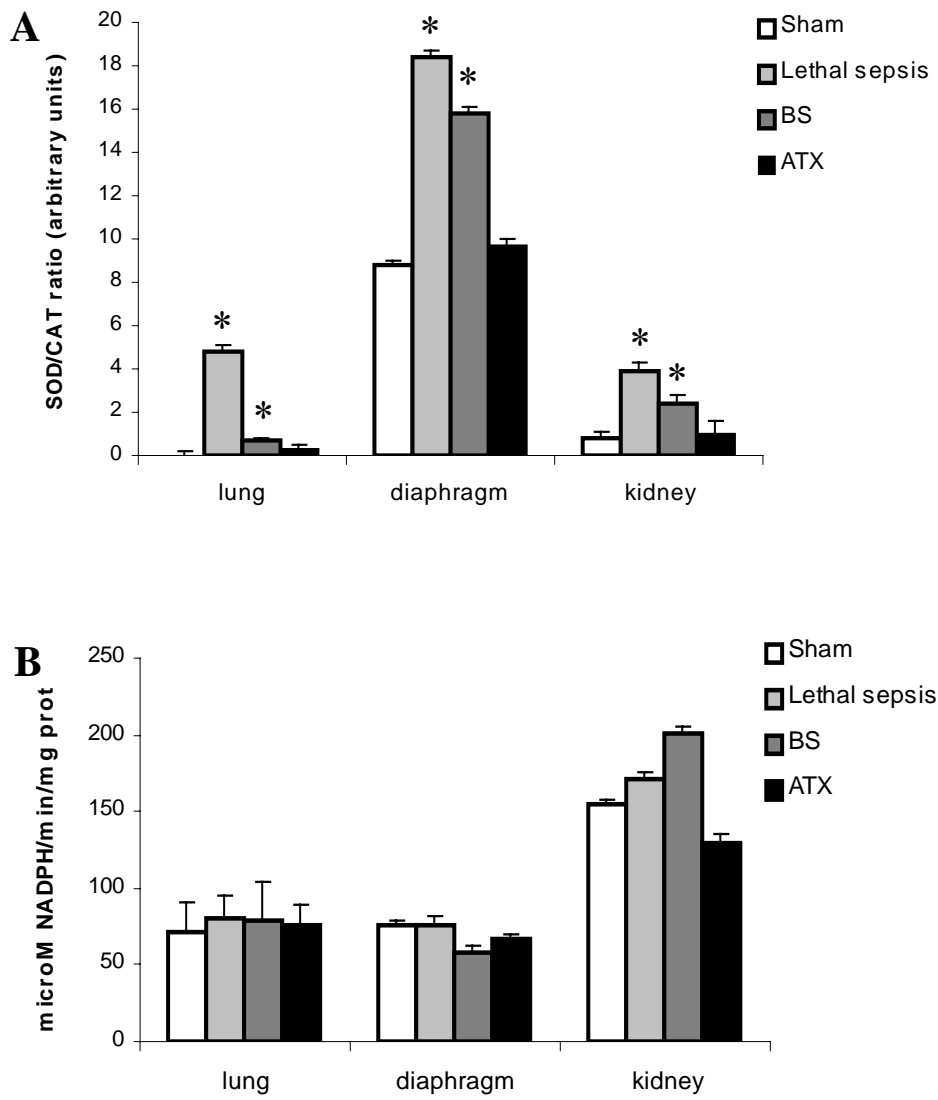


Figure 2

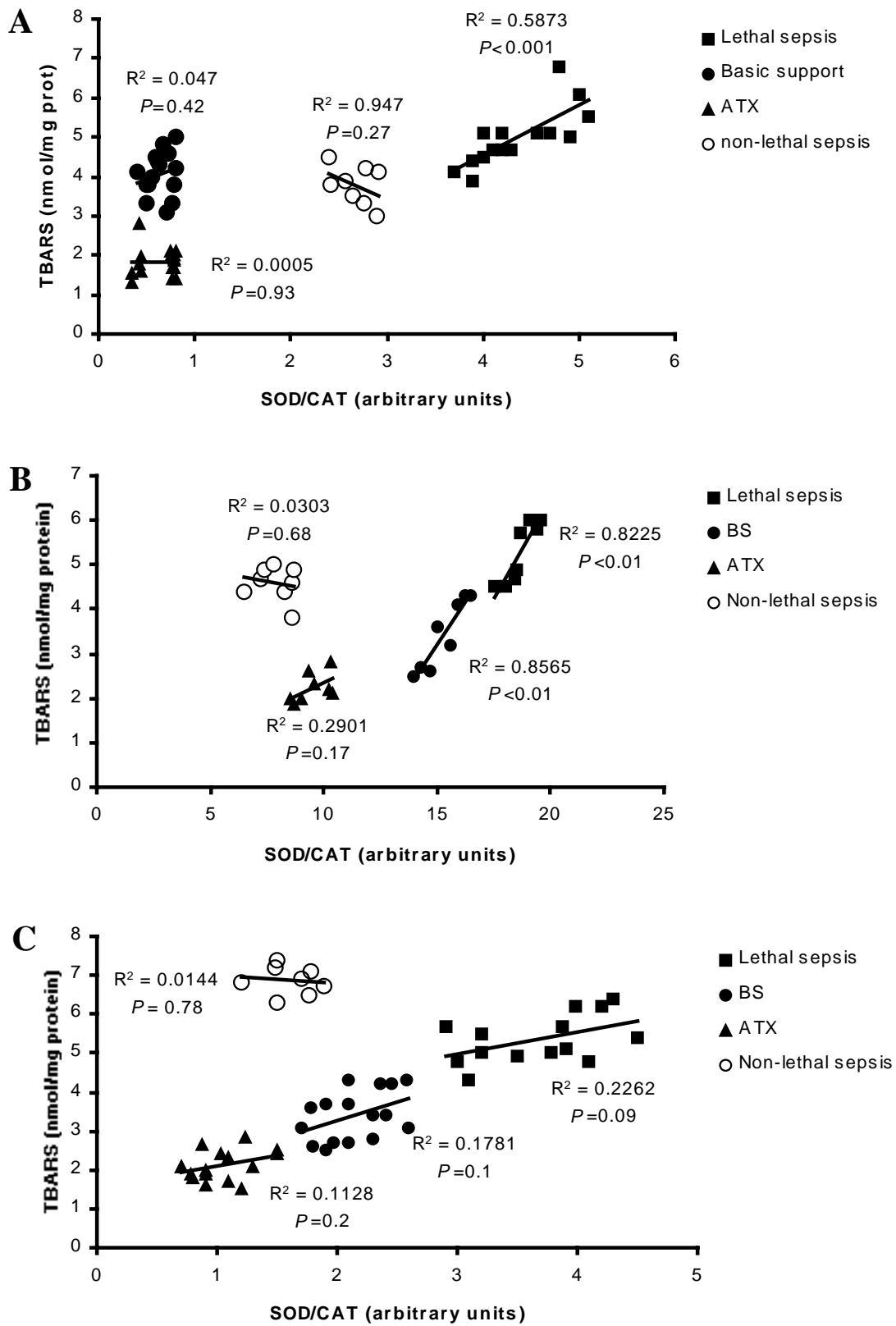


Figure 3

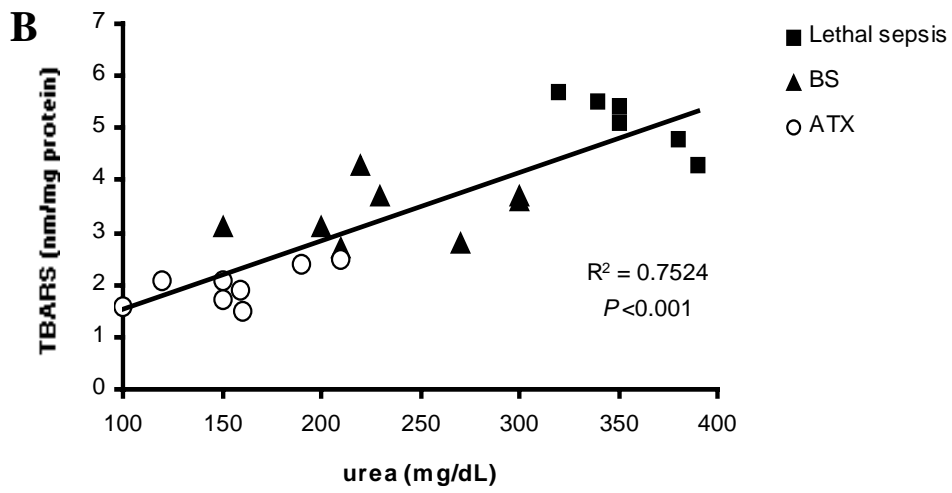
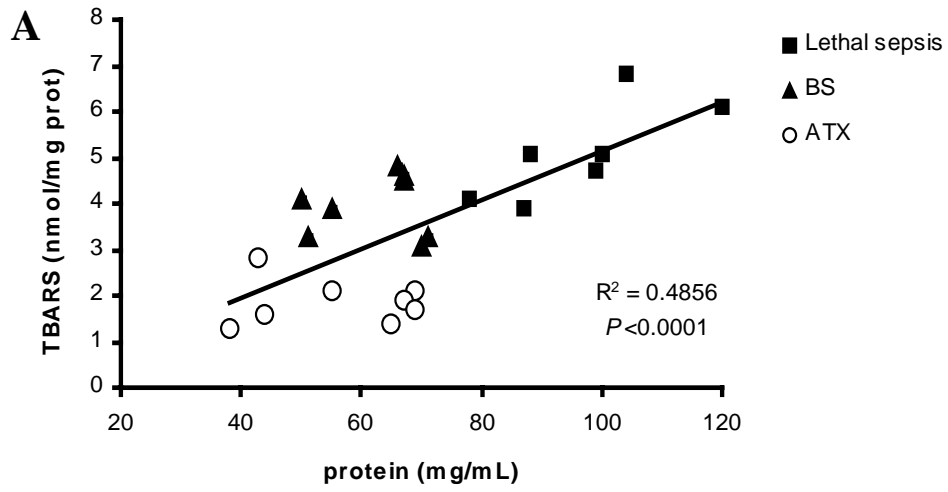
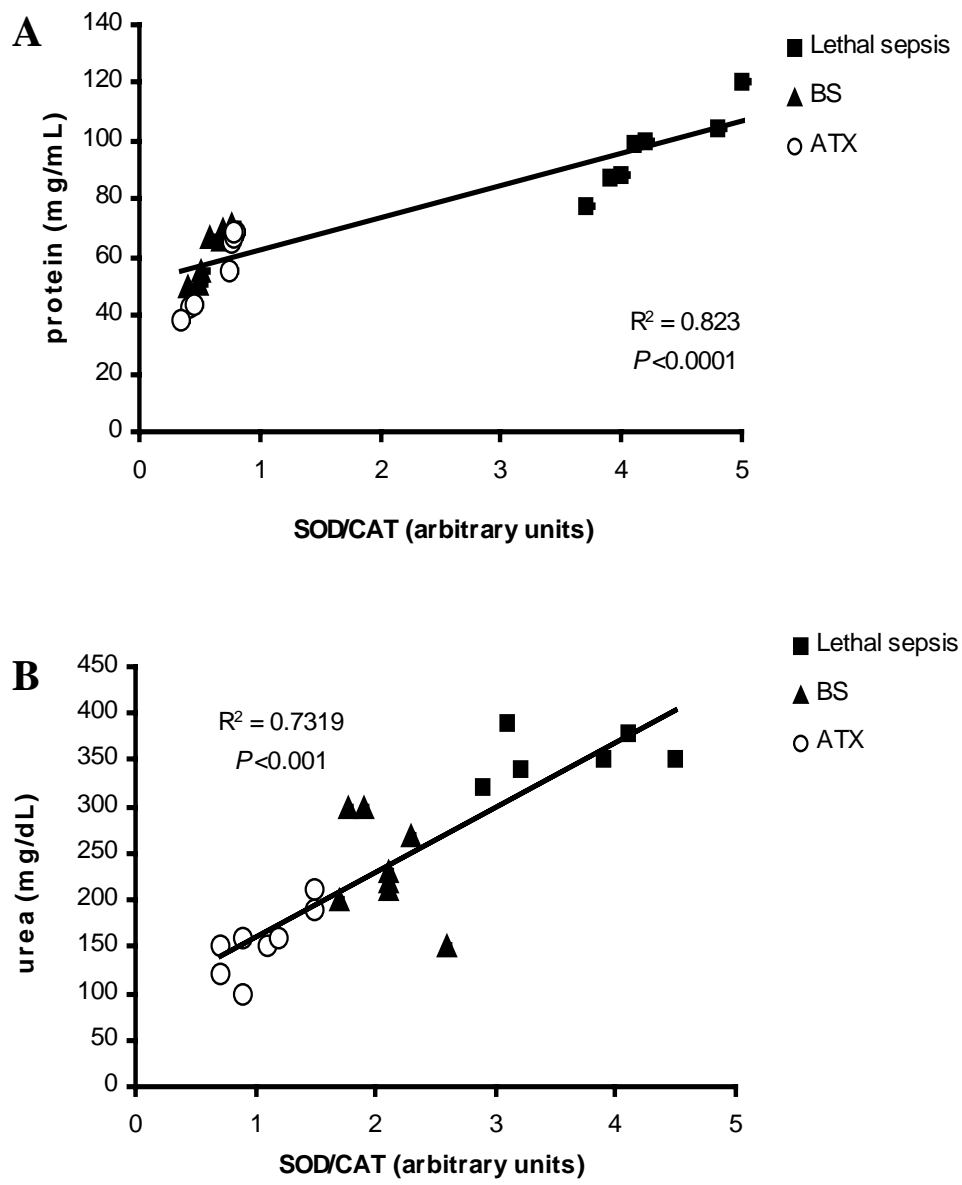


Figure 4



PARTE III

DISCUSSÃO

Diversos trabalhos demonstram efeitos da sepse sobre órgãos específicos, mas poucos fazem uma descrição sistêmica, usando as mesmas técnicas, dificultando uma comparação global que propicie o entendimento de como os órgãos se comportam no decorrer do tempo ou durante o agravamento da sepse.

E, de fato, podemos ver que a resposta dos órgãos à sepse não-letal é heterogênea. Alguns órgãos apresentam maiores níveis de danos em biomoléculas, bem como apresentam estes danos mais precocemente que outros órgãos (diafragma, pulmão e rim).

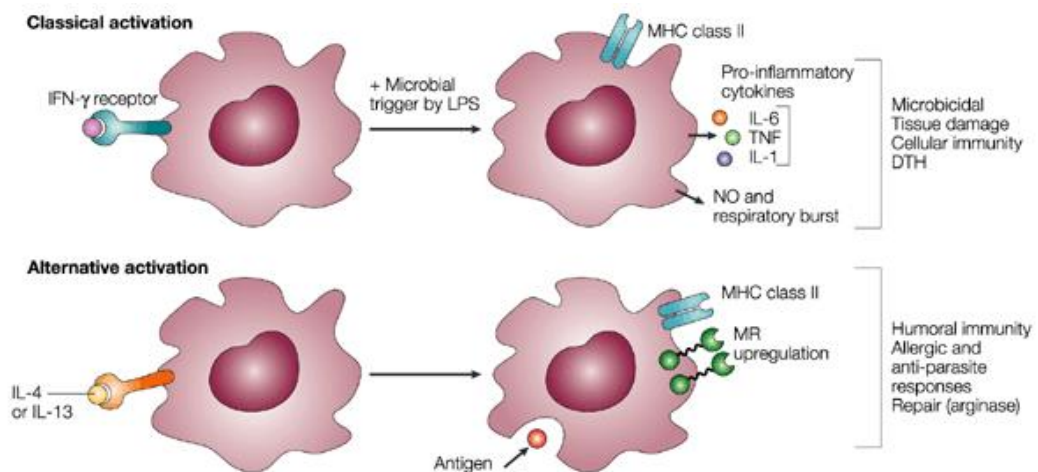
Verificamos que os níveis de TBARS se elevam precocemente na sepse letal (12 horas) enquanto que na sepse não-letal verificamos aumento significativo somente após 48 horas. Contudo, após 96 horas o grupo submetido à sepse não-letal apresenta os mesmos valores de TBARS do que o grupo submetido à sepse letal (12 horas). Analisando os danos oxidativos em proteínas, vemos que apesar de aumentarem significativamente 96 horas após a indução da sepse não-letal, eles não atingem os mesmos níveis observados na sepse letal. Estes dados nos levam a sugerir que os danos em biomoléculas estão vinculados diferentemente ao processo inflamatório da sepse. A magnitude dos danos oxidativos em lipídeos não seria tão importante quanto a magnitude dos danos em proteínas.

Este indicativo tem suporte na literatura científica, uma vez que danos de diversos tipos em proteínas têm a propriedade de modular a resposta inflamatória. Trabalhos demonstram que macrófagos cultivados sobre uma base de colágeno modificado com aldeídos respondem liberando elevada

quantidade de CCL2/MCP1 (Kirkham *et al*, 2003) e diminuindo o poder fagocitose (Kirkham *et al*, 2004).

Mais recentemente tem se difundido a noção de que macrófagos podem assumir diversas formas de ativação (Gordon, 2003). Para fins de discussão deste trabalho, são de grande relevância duas destas ativações: a ativação clássica de macrófagos (ACM) e a alternativa (AAM).

A ACM ocorre em resposta de estímulos como micróbios e dano em tecidos. Macrófagos assim ativados liberam citocinas como IL-6, IL-1, IL-12 e TNF, além de possuir um potente arsenal bactericida (produção de superóxido e NO). É de extrema importância no estabelecimento da sepse, quando há necessidade de combate vigoroso de patógenos. A AAM ocorre em resposta a alérgenos ou parasitas. Produz citocinas como IL-4, IL-13 e CCL2/MCP1, possui menor poder bactericida (menor produção de superóxido) e maior atividade de arginase (enzima que degrada a arginina, substrato na formação do NO). Este tipo de ativação é importante quando o processo infeccioso está sob controle, funcionando como maestro do restante do sistema imune regendo agora o processo de recuperação do organismo.



Ativação Clássica (ACM) e Alternativa (AAM) de Macrófagos. Figura extraída de Gordon (2003).

Takahashi *et al.* (2004) demonstraram que camundongos submetidos a SIRS leve se tornavam resistentes a uma infecção posterior. Diferentemente, quando os animais eram submetidos à SIRS severa, uma posterior infecção se tornava letal. Investigando os macrófagos peritoniais destes animais, Takahashi *et al.* (2004) descobriu que aqueles que sobreviviam apresentavam macrófagos fortemente bactericidas, com expressão de iNOS e secreção de IL-12, características de ACM.

A partir destes dados encontrados na literatura científica, nós sugerimos que o elevado dano oxidativo visto no modelo letal de sepse pode contribuir para o desfecho da doença, agindo sobre o sistema imune dos animais. Se esta hipótese estiver correta, abriria novas perspectivas terapêuticas na sepse, como a utilização de tratamentos que protegessem ou revertessem o processo de dano oxidativo em proteínas, ou ainda compostos que evitassem a sinalização destas proteínas oxidadas sobre células do sistema imune.

Para verificar se existe um desequilíbrio entre a produção de peróxido de hidrogênio e a sua degradação, nós avaliamos as atividades das enzimas SOD e CAT e obtivemos um quociente a partir da divisão de suas atividades. Aumentos deste valor representam maior atividade da SOD e/ou menor atividade da CAT, ou seja, indicam que há um excesso de peróxido de hidrogênio nos órgãos. Verificamos que este desequilíbrio existe na sepse, mas em alguns órgãos é mais evidente (coração e rim) que outros (fígado). A sepse letal apresentou os maiores valores de quociente. O aumento na atividade da enzima SOD pode ser causado pela elevação nas concentrações de moléculas como IL-1, TNF e LPS. Trabalhos *in vitro* ajudaram a demonstrar que estes compostos promovem o aumento de mRNA da SOD mitocondrial (Visner *et al.*,

1990). De fato, níveis TNF, LPS e IL-1 aumentam de acordo com o aumento do diâmetro da agulha usada na punção do ceco (Ebong *et al*, 1999; Otero-Antón, 2000).

Esse desequilíbrio na sepse letal é um dos mecanismos para explicar os danos vistos em lipídeos e proteínas uma vez que promove um excesso de produção e peróxido de hidrogênio que pode reagir com metais e formar o radical hidroxil (Kelner *et al*, 1995). Esta sugestão fica mais forte quando analisamos os órgãos (diafragma, pulmão e rim) de animais submetidos a sepse letal que foram tratados com terapia antioxidante. Tanto a relação SOD/CAT quanto o dano oxidativo em lipídeos pode ser revertido com este tratamento. O mecanismo de ação da terapia antioxidante ainda não está bem compreendido. Os compostos utilizados foram a deferoxiamina, que tem a propriedade de quelar ferro, e a N-acetilcisteína, precursor de glutathione e antioxidante *per se*, uma vez que possui um resíduo de cisteína reduzida.

Como forma de verificar a associação entre o desequilíbrio enzimático e os danos oxidativos, nós realizamos análises de correlação. É importante ressaltar que a simples associação entre duas variáveis não implica em causalidade. Contudo, outros grupos demonstram através da aplicação de técnicas de biologia molecular que o equilíbrio enzimático entre a SOD e a CAT implica em dano e/ou susceptibilidade celular (Lortz e Tiedge, 2003).

Curiosamente, os órgãos de animais submetidos a sepse leve não apresentaram correlação entre o desequilíbrio SOD/CAT e o dano oxidativo. Este dado sugere que as defesas antioxidantes não-enzimáticas se mantêm preservadas nestes animais e ajudam a manter a homeostase. De fato, pacientes que apresentam sepse associada à falência de órgãos possuem uma

diminuição de vitaminas C e E, retinol, licopeno e betacaroteno (Borrelli *et al*, 1996; Goode *et al*, 1995; Tsai *et al*, 2000). Ainda, verificamos que o tratamento com antioxidantes reverte a correlação entre SOD/CAT e danos oxidativos.

Como foi dito antes, é sugerido que o dano oxidativo participa em diversos eventos que levam ao agravamento da sepse e a morte. Existem trabalhos que analisam a correlação entre marcadores de falência de órgãos e danos oxidativos. Estes trabalhos freqüentemente analisam danos oxidativos em proteínas e/ou lipídeos plasmáticos, mas não há trabalhos que associem o dano oxidativo no órgão com marcadores de falência deste órgão. Para este fim, o uso de animais de laboratório é uma importante ferramenta, visto a dificuldade de se conseguir material humano. Neste trabalho nós verificamos que o aumento de dano oxidativo em lipídeos no pulmão e no rim está positivamente correlacionado com marcadores de falência destes órgãos (proteína no fluido bronco-alveolar, indicando permeabilidade capilar e uréia plasmática, indicando falha na capacidade filtradora do rim) quando analisamos a sepse sem distinguir tratamentos.

Quando analisamos a correlação entre danos oxidativos no rim e a uréia plasmática no grupo submetido à sepse que não recebeu tratamentos, verificamos uma relação inversa. Infelizmente não possuímos uma explicação para essa aparente contradição, apenas podemos sugerir possibilidades: 1 - os danos podem estar ocorrendo em outras biomoléculas que não foram analisadas neste trabalho (proteínas e/ou DNA, por exemplo); 2 - que a falência renal possa causar um aumento na degradação desses lipídeos oxidados. Outros estudos dever ser realizados para a verificação destas hipóteses. O pulmão apresentou correlação positiva entre as duas variáveis.

O tratamento com antioxidante foi capaz de eliminar ambas as correlações, bem como prevenir as falências renal e respiratória. A falência renal está fortemente associada ao equilíbrio vascular (Schrier e Wang, 2004), portanto um possível mecanismo pelo qual o tratamento com antioxidantes exerce seus efeitos sobre o rim é através da prevenção de coagulopatias e promovendo a adequada resposta vascular a vasoconstritores. Além disso, um estudo com 345 pacientes que apresentavam falência renal aguda com e sem sepse demonstrou que a necessidade de ventilação mecânica e a mortalidade era maiores no grupo com sepse (Neveu *et al*, 1996). Estes dados sugerem um dos mecanismos de ação do tratamento antioxidante usado neste trabalho, mas ainda são necessários trabalhos com o sistema vascular para confirmar a hipótese formulada aqui.

A partir dos dados apresentados neste trabalho, concluímos que:

1. Há um desequilíbrio entre as enzimas SOD e CAT na sepse e este desequilíbrio é mais acentuado na modelo de sepse letal.
2. Na sepse letal, a atividade da GPx não é modulada pela sepse nos órgãos analisados (diafragma, pulmão e rim), de forma que o balanço entre as atividade da SOD e CAT ganham mais importância na definição entre as duas severidades da doença.
3. O dano oxidativo em lipídeos é igual nas duas severidades analisadas neste trabalho, mas ocorre tardiamente na sepse não-letal. O dano oxidativo em proteínas é muito maior nos órgãos dos animais submetidos à sepse letal, de forma que pode ser um dos mecanismos que determinam a mortalidade na sepse.

4. Existe correlação entre a relação SOD/CAT nos órgãos analisados (rim e pulmão) com marcadores de falência destes órgãos. O dano oxidativo em biomoléculas também é correlacionado aos índices de falência orgânica.
5. O tratamento com antioxidantes reverteu o desequilíbrio entre a SOD e a CAT, o dano oxidativo em biomoléculas e a falência renal e respiratória.

Estes resultados ajudam a esclarecer a fisiopatologia da sepse e tornam mais evidente a importância dos radicais livres na progressão e desfecho desta doença, abrindo novas perspectivas terapêuticas, como a administração de antioxidantes que ajam sobre o peróxido de hidrogênio ou hidroxil.

Referências:

Abraham E, Laterre PF, Garg R, Levy H, Talwar D, Trzaskoma BL, Francois B, Guy JS, Bruckmann M, Rea-Neto A, Rossaint R, Perrotin D, Sablotzki A, Arkins N, Utterback BG, Macias WL. Drotrecogin Alfa (Activated) for Adults with Severe Sepsis and a Low Risk of Death. *N Engl J Med* 353(13):1398-1400, 2005.

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* 29(7):1303-1310, 2001.

Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr. *N Engl J Med* 344:699-709, 2001.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101(6):1644-1655, 1992.

Borrelli E, Roux-Lombard P, Grau GE, Girardin E, Ricou B, Dayer J, Suter PM. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Crit Care Med*.24(3):392-7, 1996.

Bray RC, Cockle SA, Fielden EM, Roberts PB, Rotilio G, Calabrese L. Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem J.* 139(1):43-48, 1974.

Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov* 4(10):854-865, 2005.

Dal-Pizzol F, Klamt F, Frota ML Jr, Andrades ME, Caregnato FF, Vianna MM, Schroder N, Quevedo J, Izquierdo I, Archer T, Moreira JC. Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult Wistar rat. *Brain Res* 130(1):109-114, 2001.

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186:421-431, 1990.

Ebong S, Call D, Nemzek J, Bolgos G, Newcomb D, Remick D. Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect Immun* 67(12):6603-6610, 1999.

Eskandari MK, Bolgos G, Miller C, Nguyen DT, DeForge LE, Remick DG. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. *J Immunol.* 148(9):2724-2730, 1992.

Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18(10):872-879, 2002.

Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 272(30):18515-18517, 1997.

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* 23(4):646-651, 1995.

Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3(1):23-35, 2003.

Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the Neutrophil Pagosome: Oxidants, Myeloperoxidase and Bacterial Killing. *Blood* 92(9):3007-3017, 1998.

Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW 3rd, Bland KI, Chaudry IH. Cecal ligation and puncture. *Shock Suppl* 1:52-57, 2005.

Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med* 39(7):841-852, 2005.

Kelner MJ, Bagnell R, Montoya M, Estes L, Ugluk SF, Cerutti P. Transfection with human copper-zinc superoxide dismutase induces bidirectional alterations

in other antioxidant enzymes, proteins, growth factor response, and paraquat resistance. *Free Radic Biol Med* 18(3):497-506, 1995.

Kirkham PA, Spooner G, Rahman I, Rossi AG. Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is compromised by matrix proteins modified by cigarette smoke and lipid peroxidation products. *Biochem Biophys Res Commun* 318(1):32-37, 2004.

Kirkham PA, Spooner G, Ffoulkes-Jones C, Calvez R. Cigarette smoke triggers macrophage adhesion and activation: role of lipid peroxidation products and scavenger receptor. *Free Radic Biol Med* 35(7):697-710, 2003.

Klamt F, Dal-Pizzol F, Conte da Frota ML JR, Walz R, Andrades ME, da Silva EG, Brentani RR, Izquierdo I, Fonseca Moreira JC. Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic Biol Med* 30(10):1137-1144, 2001.

Klamt F, Roberto de Oliveira M, Moreira JC. Retinol induces permeability transition and cytochrome c release from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1726(1):14-20, 2005.

Kono Y, Fridovich I. Superoxide Radical Inhibits Catalase. *J Biol Chem* 257(10):5751-5754, 1982.

Levine RL, Garland D, Oliver CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464-478, 1990.

Lortz S, Tiedge M. Sequential inactivation of reactive oxygen species by combined overexpression of SOD isoforms and catalase in insulin-producing cells. *Free Rad Biol Med* 34(6):683-688, 2003.

Macarthur H, Westfall TC, Riley DP, Misko TP, Salvemini D. Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(17):9753-9758, 2000.

McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem.* 244(22):6056-6063, 1969.

Murata M, Kawanishi S. Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivative via superoxide generation. *J Biol Chem* 275(3):2003-2008, 2000.

Myhrstad MCW, Carlsen H, Nordström O, Blomhoff R, Moskaug J. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the γ -glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Rad Biol Med* 32(5):386-393, 2002.

Neveu H, Kleinknecht D, Brivet F, Loirat P, Landais P. Prognostic factors in acute renal failure due to sepsis. Results of a prospective multicentre study.

The French Study Group on Acute Renal Failure. *Nephrol Dial Transplant* 11(2):293-299,1996.

Otero-Antón E, Gonzales-Quintela A, López-Soto A, López-Bem S, Llovo J, Pérez LF. Cecal Ligation and Puncture as a Model of Sepsis in the Rat: Influence of the Puncture Size on Mortality, Bacteremia, Endotoxemia and Tumor Necrosis Factor Alpha Levels. *European Surgical Research*, 33:77-79, 2001.

Paterson RL, Galley HF, Webster NR. The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor-kappa B activation, interleukin-6, interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. *Crit Care Med* 31(11):2574-2578, 2003.

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* 29(10):1782-1789, 2003.

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* 32(2):342-349, 2004.

Rivers EP, McIntyre L, Morro DC, Rivers KK. Early and innovative interventions for severe sepsis and septic shock: taking advantage of a window of opportunity. *Canadian Association Medical Journal* 173(9):1054-1065, 2005.

Schrier RW, Wang W. Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med* 351(2):159-169, 2004.

Singleton KD, Wischmeyer PE. Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. *Eur Surg Res.* 35(6):486-91, 2003.

Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assuncao M, Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Correa AD, Vieira PC, Knobel E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care* 8(4):R251-260, 2004.

Takahashi H, Tsuda Y, Takeuchi D, Kobayashi M, Herndon DN, Suzuki F. Influence of systemic inflammatory response syndrome on host resistance against bacterial infections. *Crit Care Med* 32(9):1879-1885, 2004.

Tsai K, Hsu T, Kong C, Lin K, Lu F. Is the endogenous peroxy-radical scavenging capacity of plasma protective in systemic inflammatory disorders in humans? *Free Radic Biol Med* 28(6):926-933, 2000.

van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med.* 345(19):1359-1367, 2001.

Visner GA, Dougall WC, Wilson JM, Burr IA, Nick HS. Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J Biol Chem* 265(5):2856-2864, 1990.

Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285(5425):248-251, 1999.