



UNISUL

UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA

FERNANDA SILVESTRE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE
SELÊNIO SOB PARÂMETROS DE DANO OXIDATIVO E MITOCONDRIAL EM
CÉREBRO DE RATOS SUBMETIDOS À SEPSE**

Tubarão

2013

FERNANDA SILVESTRE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE
SELÊNIO SOB PARÂMETROS DE DANO OXIDATIVO E MITOCONDRIAL EM
CÉREBRO DE RATOS SUBMETIDOS À SEPSE**

Dissertação de mestrado, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde, da Universidade do Sul de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Fabricia Cardoso Petronilho, Dra.

Tubarão
2013

FERNANDA SILVESTRE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE
SELÊNIO SOB PARÂMETROS DE DANO OXIDATIVO E MITOCONDRIAL EM
CÉREBRO DE RATOS SUBMETIDOS À SEPSE**

Esta Dissertação foi julgada adequada à obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Ciências da Saúde, da Universidade do Sul de Santa Catarina.

Tubarão, 08 de maio de 2013.

Orientadora: Prof^a. Fabricia Cardoso Petronilho, Dra.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Prof^a. Josiane Budni, Dra.
Universidade do Extremo Sul Catarinense

Prof^a. Jucelia Jeremias Fortunato, Dra.
Universidade do Sul de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional.

À Prof. Dra. Fabrícia Petronilho, pela atenção, conhecimento e sabedoria na orientação deste trabalho.

À Prof. Gislaine Rezin, pela co-orientação.

As meninas do laboratório LAFICEXP, em especial a Lucinéia Gainski Danielski que me ensinou tudo sobre a parte prática no laboratório.

E a todas as pessoas que participaram de alguma forma deste trabalho.

RESUMO

As manifestações neurológicas agudas em pacientes com sepse estão associadas à diminuição da qualidade de vida e aumento de mortalidade e certos aspectos dessas alterações resultam de mecanismos fisiopatológicos como o estresse oxidativo. Nesse contexto, estudos mostram que substâncias antioxidantes podem exercer um papel importante na atenuação de mecanismos associados à disfunção cerebral tais como o estresse oxidativo e disfunção energética mitocondrial. Assim, visto que a literatura nos fornece informações importantes sobre o papel antioxidante de compostos de selênio como o disseleneto de difenila (DD) e o ebselen (EB) no Sistema Nervoso Central, avaliamos os efeitos desses compostos na disfunção cerebral em ratos submetidos ao modelo animal de sepse. Foram utilizados ratos Wistar machos submetidos à sepse por ligação e perfuração cecal (CLP), que logo após foram tratados com doses via oral de EB (50 mg/kg), DD (50 mg/kg) ou veículo (óleo). Doze e 24h após CLP os ratos foram sacrificados e amostras de estruturas cerebrais (hipocampo, estriado, cerebelo, córtex pré-frontal e córtex) foram obtidas e analisadas sob parâmetros de danos oxidativos pelas técnicas de avaliação de dano em lipídios através da mensuração da formação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, dano em proteínas pela formação de grupamentos carbonilas e avaliação dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial além da atividade da enzima creatina quinase. Observamos em nossos resultados a diminuição do dano oxidativo em lipídios e proteínas em diferentes estruturas cerebrais nos tempos estudados com a administração de DD, no entanto EB parece não exercer o mesmo efeito. Tais alterações se refletem na avaliação dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial através da reversão da diminuição da atividade dos complexos causada pelo modelo de CLP. No entanto, para a atividade de creatina quinase, somente em 24 horas encontramos resultados positivos com o aumento da atividade através da administração de DD. Nesse sentido, nossos resultados sugerem que DD pode ser um importante alvo terapêutico para a disfunção cerebral associada a sepse por reverter o dano oxidativo, a disfunção energética e a atividade da creatina quinase mostrando-se mais eficaz que EB.

Palavras-chave: Sepse. Selênio. Dano oxidativo. Cérebro. Antioxidante.

ABSTRACT

The neurological manifestations in patients with acute sepsis as well as cognitive impairment in survivors of sepsis are associated with decreased quality of life and increased mortality and certain aspects of these changes result from pathophysiological mechanisms as oxidative stress. In this context, studies show that antioxidants may play a role in attenuating mechanisms associated with brain dysfunction such as oxidative stress and mitochondrial dysfunction energy. Thus, the literature provides us with important information about the antioxidant role of selenium compounds in the central nervous system, we intend to evaluate the effects of ebselen and diphenyl diselenide in early and late brain dysfunction in rats submitted to an animal model of sepsis. Male Wistar rats were subjected to sepsis by cecal ligation and puncture (CLP), which after treated with oral doses of EB (50 mg / kg), DD (50 mg / kg) or vehicle (oil). Twelve and 24 h after CLP, the rats were sacrificed and samples of brain structures (hippocampus, striatum, cerebellum, and prefrontal cortex) were obtained and analyzed under the parameters of oxidative damage assessment techniques in lipid damage by measuring the formation of thiobarbituric acid reactive substances, protein damage by the formation of carbonyl groups and evaluation of mitochondrial respiratory chain complexes besides the activity of the enzyme creatine kinase. Our results observed in the reduction of oxidative damage to lipids and proteins in the different cerebral structures studied times with the administration of DD, however EB seems to exert the same effect. Such changes are reflected in the assessment of mitochondrial respiratory chain complexes by reversing the decreased activity of the complex caused by the model of CLP. However, for the activity of creatine kinase in 24 hours only positive results found with increased activity through the administration of DD. In this sense, our results suggest that DD may be an important therapeutic target for brain dysfunction associated with sepsis by reversing oxidative damage, dysfunction and energy creatine kinase activity being more effective than EB.

Keywords: Sepsis. Selenium. Oxidative stress. Brain. Antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água.	14
Figura 2 - Reação de Fenton.....	15
Figura 3 - Reação de <i>Haber-Weiss</i>	16
Figura 4 - Reação de dismutação do radical superóxido.	17
Figura 5 - Reação de decomposição do H_2O_2 ao O_2 pela enzima catalase.	18
Figura 6 - Sistema glutathiona peroxidase/reductase.	19
Figura 7 - Cadeia respiratória mitocondrial.....	20
Figura 8 - O sistema creatina quinase/fosfocreatina/creatina como sistema de tamponamento dos níveis de ATP celular.	21
Figura 9 - Estrutura química do EB.	22
Figura 10 - Estrutura química do DD.....	23

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Níveis de TBARS em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 12 horas após a sepse.....	31
Gráfico 2 - Níveis de proteínas carboniladas em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 12 horas após a sepse.....	32
Gráfico 3 - Níveis da atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 12 horas após a sepse.....	33
Gráfico 4 - Níveis da atividade do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 12 horas após a sepse.....	34
Gráfico 5 - Níveis da atividade do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 12 horas após a sepse.....	35
Gráfico 6 - Níveis da atividade da CK em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 12 horas após a sepse.....	36
Gráfico 7 - Níveis de TBARS em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 24 horas após a sepse.....	37
Gráfico 8 - Níveis de proteínas carboniladas em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 24 horas após a sepse.....	38
Gráfico 9 - Níveis da atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial em estruturas cerebrais de ratos submetidos a sepse e tratados com DD ou EB 24 horas após a sepse.....	39
Gráfico 10 - Níveis da atividade do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 24 horas após a sepse.....	40
Gráfico 11 - Níveis da atividade do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 24 horas após a sepse.....	41
Gráfico 12 - Níveis da atividade da CK em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 24 horas após a sepse.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP - Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

BHE – Barreira hematoencefálica

CAT - Catalase

CEUA – Comitê de ética no uso de animais

CK – Creatina quinase

CLP – Ligação e perfuração cecal

DD – Disseleneto de difenila

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EB - Ebselen

ERO – Espécies reativas de oxigênio

GPx – Glutaciona peroxidase

GSH – Glutaciona reduzida

IL – Interleucina

ILAS – Instituto Latino Americano de Sepse

LPS – Lipopolissacarídeo

LTA – Ácido lipoteicóico

MMP – Metaloproteinase

NMDA – N-metil d-aspartato

SIRS – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TLR – Receptor toll-like

TNF – Fator de necrose tumoral

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 SEPSE: DEFINIÇÃO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	10
1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE	11
1.3 ENCEFALOPATIA SÉPTICA	12
1.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ANTIOXIDANTES	14
1.5 METABOLISMO ENERGÉTICO	19
1.6 COMPOSTOS DE SELÊNIO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS	21
1.7 MODELO ANIMAL DE SEPSE	23
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 TIPO DE ESTUDO	27
4.1.1 Bioética	27
4.1.2 Animais	27
4.1.3 Indução de sepse	27
4.1.4 Tratamentos e obtenção das amostras	28
4.1.5 Testes bioquímicos	28
4.1.5.1 Determinação do dano oxidativo	28
4.1.5.2 Determinação dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial	29
4.1.5.3 Determinação da atividade da creatina quinase (CK)	29
4.1.5.4 Determinação de proteínas totais	29
4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5 RESULTADOS	31
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 SEPSE: DEFINIÇÃO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A sepse e suas consequências respondem por cerca de 20% das internações em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e constituem as causas mais comuns de mortalidade nessas unidades (LEVI et al., 2010). Apesar dos consideráveis avanços, a sepse continua sendo uma importante causa de mortalidade, com uma incidência estimada de 400.000 casos por ano nos Estados Unidos, com metade deles evoluindo para choque séptico (DOMBROVSKY et al., 2007). Dados divulgados pelo Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS) mostram que a mortalidade por sepse é de 51,9% e 30,8% no Brasil e no mundo, respectivamente (INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE, 2012).

A sepse é a resposta inflamatória caracterizada por desenvolvimento de alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas e imunológicas associadas à infecção, a qual quando complicada pela disfunção orgânica é denominada sepse severa. Diversos quadros clínicos representam diferentes fases evolutivas de uma entidade fisiopatológica única, cuja evolução se não contida, é a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (VINCENT; KORKUT, 2008).

Em 1991, na Conferência de Consenso feita pela *American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine* foram estabelecidos critérios para a classificação de sepse e doenças similares (BONE et al., 1992). Optou-se por enquadrá-las como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). Além disso, ficou estabelecido que o termo sepse deve ser utilizado nos casos onde há infecção, pois a SIRS pode ser causada por diversos outros insultos (além da infecção por bactérias, vírus e fungos) considerados “estéreis” tais como trauma, queimaduras, choque hemorrágico e pancreatite aguda (BEISHUIZEN; VERMES; HAANEN, 1999).

Esta medida foi necessária para adequação do tratamento à fase de evolução da síndrome em que o paciente se encontra. Esses parâmetros vêm sendo reavaliados nas subsequentes conferências e hoje compõe as diretrizes da “*Surviving Sepsis Campaign*” para diagnóstico precoce e tratamento adequado em cada etapa do processo fisiopatológico da sepse, com objetivo único de diminuir a taxa de mortalidade (VINCENT; KORKUT, 2008).

Mesmo com sua importância na mortalidade global em UTIs, os tratamentos atualmente empregados são meramente de suporte. Um melhor entendimento da fisiopatologia da sepse pode fornecer dados preliminares e novos protocolos experimentais de tratamento, para serem posteriormente validados em ensaios clínicos e empregados na prática médica (REINHART; KARZAI, 2001).

Classicamente os pesquisadores que trabalham com sepse têm focado atenção na disfunção de múltiplos órgãos do ponto de vista dos órgãos periféricos, ficando a disfunção do Sistema Nervoso Central (SNC) em segundo plano. Entretanto, cada vez mais tem se dado atenção à disfunção neurológica na sepse, tanto em sua fase aguda, quanto em sua fase crônica. Os mecanismos associados a estas alterações não são bem entendidos, mas podem incluir o estresse oxidativo e a disfunção energética cerebral (MESSARIS; MEMOS; CHATZIGIANNI, 2004).

1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

Todo processo infeccioso desencadeia uma resposta inflamatória no hospedeiro, cuja magnitude pode variar de indivíduo para indivíduo. A interação complexa entre o organismo e o agente causador resulta no processo fisiopatológico que antigamente era definido como septicemia e hoje é denominado sepse (VINCENT; KORKUT, 2008).

Os fatores desencadeadores da ativação celular e da cascata de eventos plasmáticos são principalmente os componentes da parede celular dos microorganismos, como o ácido lipoteicóico (LTA) e peptidoglicados, derivados de bactérias Gram-positivas (exotoxinas), ou o lipopolissacarídeo (LPS), no caso de bactérias Gram-negativas (endotoxinas). O LPS e as exotoxinas são liberados normalmente durante a replicação da bactéria e/ou como consequência de sua morte, devido à lise da parede celular (TRANTAFILOU; TRIANTAFILOU, 2002).

A falta de um receptor para LPS foi durante muitos anos uma barreira no entendimento de como bactérias Gram-negativas disparavam a resposta inflamatória que resultava no choque séptico. Porém, descobriu-se que a ativação de macrófagos estimulados por LPS é dependente da presença de proteínas ligadoras de LPS (LBP) e da proteína de membrana CD-14 (COHEN, 2002; LIEW et al., 2005). A LBP é uma proteína de fase aguda que catalisa a transferência do LPS para CD-14 potencializando a ativação de macrófagos. A interação LPS-LBP-CD-14

se faz por um componente da família dos receptores *Toll*. O CD-14 em conjunto com a proteína de diferenciação mielóide-2 (MD-2), participa da apresentação de LPS para o receptor similar ao *Toll* e em 1998, Poltorak e colaboradores (1998), mostraram que a sinalização pelo LPS é transmitida pelo receptor *Toll-like-4* (TLR-4).

Nesse contexto, células residentes têm um papel chave, liberando uma grande variedade de moléculas sinalizadoras como prostaglandinas, leucotrienos, citocinas e quimiocinas que desencadeiam a resposta inflamatória, culminando no recrutamento e ativação de leucócitos para o local da infecção, representando uma das funções mais importantes da imunidade inata (JANEWAY, 2001).

Dentre os mediadores endógenos liberados primeiramente pelas células residentes e, posteriormente, pelas células recrutadas para o foco infeccioso, as citocinas desempenham um papel primordial na resposta do hospedeiro. Citocinas como a interleucina- β (IL- β), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a interleucina-8 (IL-8) e as demais quimiocinas promovem o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório, sendo a resposta local fundamental para o controle da infecção. A evolução de uma infecção localizada para um quadro sistêmico caracteriza-se pela ativação das células circulantes, podendo, também, haver a presença de bactérias, endotoxinas ou exotoxinas. As mesmas citocinas encontradas no local da infecção estão presentes na circulação, esse fato é responsável pela maioria das alterações fisiopatológicas, observadas em um quadro clínico de sepse (MOTOYAMA et al., 2003).

1.3 ENCEFALOPATIA SÉPTICA

Sepse sistêmica comumente produz disfunção cerebral, que pode variar de uma encefalopatia transitória reversível a danos cerebrais irreversíveis (MOTOYAMA et al., 2003). Apesar de a fisiopatologia da encefalopatia séptica não ser bem determinada, provavelmente deva ter origem multifatorial. Diversos fatores de risco têm sido descritos e podem ser categorizados como: a) condição pré-existente do paciente (como p. ex. idade, história de depressão, doença hepática, doença renal); b) condição aguda do paciente (como p.ex. overdose de drogas, febre) e c) fatores iatrogênicos ou ambientais (como p.ex. uso de sedativos, alimentação enteral, catéter venoso central) (JACKSON et al., 1985).

Dados experimentais sugerem que um número de fatores, incluindo geração local de citocinas pró-inflamatórias, microcirculação cerebral prejudicada, desequilíbrio em neurotransmissores e um impacto negativo de falência de órgãos periféricos contribuem para o desenvolvimento da encefalopatia séptica (SEMMLER et al., 2007).

Os mediadores inflamatórios liberados prejudicam a função mitocondrial e utilização de oxigênio pelo cérebro. Estes mediadores também podem aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), resultando em edema perivascular e rompimento de astrócitos. Estas mudanças parecem causar extensa lesão neuronal e, assim, existe a possibilidade que os pacientes que se recuperam de sepse podem ter déficits neurológicos a longo prazo (BARICHELLO et al., 2006).

Nesse sentido tem-se visto que durante a sepse severas anormalidades são observadas como desorientação, confusão, letargia e coma conforme Gofton e Young (2012), e em modelos animais de sepse, ocorre a encefalopatia aguda onde os ratos sobreviventes apresentam déficit cognitivo secundários a danos ao SNC (PAPADOPOULOS et al., 2000).

Tais danos podem ser explicados, em parte, pelo fato de que o tecido nervoso cerebral apresenta características únicas que os tornam especialmente suscetíveis a danos durante a sepse, como sua alta taxa de consumo de oxigênio e baixos níveis de defesas antioxidantes (D'ÁVILA, 2008). Portanto, sabe-se que cérebro utiliza 20% do oxigênio de todo o organismo, do qual mais de 90% é usado pela mitocôndria para gerar adenosina trifosfato (ATP). Todo esse processo pode ser alterado através de lesões a partir da liberação de agentes como os radicais livres, que podem induzir a peroxidação lipídica e desnaturação de proteínas e DNA, levando a morte celular (GIL; GOMEZ; GOMEZ, 2008).

Diversos estudos mostram o envolvimento do estresse oxidativo e alterações na atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial em modelo animal de sepse decorrentes de fontes como a alteração da função mitocondrial ou pelo aumento da atividade microbicida de células como neutrófilos ativados (COMIN et al., 2011; DAL-PIZZOL et al., 2010). Estudos ainda indicam que a sepse está associada a um aumento do neurotransmissor excitatório glutamato na fenda sináptica, devido a diminuição na sua recaptação levando a uma superestimulação de receptores N-metil d-aspartato (NMDA) resultando no aumento

de cálcio intracelular e na produção de EROs, podendo provocar danos celulares que culminam em morte neuronal (DAL-PIZZOL et al., 2010).

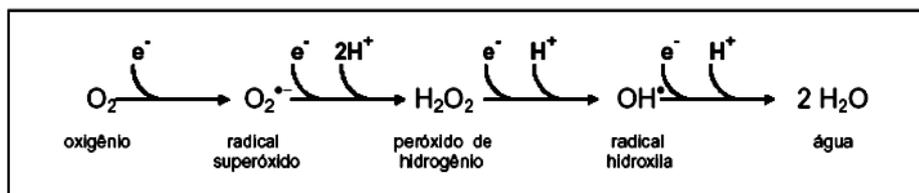
1.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ANTIOXIDANTES

Define-se radical livre como qualquer átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons desemparelhados (GILGUN-SHERKI et al., 2002; HORTON, 2003). Podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou no caso do rompimento de uma ligação covalente, caso cada um dos átomos envolvidos fiquem com um elétron. Essa situação energeticamente instável é o que confere alta reatividade a essas espécies (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Quando um radical livre reage com um composto não-radical, outro radical livre pode ser formado; assim, a presença de um único radical pode iniciar uma seqüência de reações em cadeia de transferência de elétrons. As reações em cadeia são finalizadas somente quando dois radicais livres se encontram, uma vez que eles podem combinar seus elétrons sem par e se unir para formar uma ligação covalente (MAXWELL, 1995; FRIDOVICH et al., 1998).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio molecular (O_2) sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação da água (H_2O). Cabe a citocromo oxidase mitocondrial a função de acrescentar quatro elétrons em cada molécula de oxigênio para gerar duas moléculas de água (BERGENDI et al., 1999). Porém, devido a sua configuração eletrônica, o oxigênio tem uma forte tendência a receber um elétron de cada vez (Figura 1), formando compostos intermediários altamente reativos, como o ânion radical superóxido (O_2^-). Sendo formado principalmente através da cadeia transportadora de elétrons ou por ação de células fagocitárias, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que isoladamente é praticamente inócuo, porém pode se difundir facilmente através das membranas celulares e tem potencial de gerar o radical hidroxil (OH^\cdot), sendo que alguns destes compostos são formados em, aproximadamente, 5% do processo de transformação celular do oxigênio até a água (GÜÇİN et al., 2004).

Figura 1 - Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água.

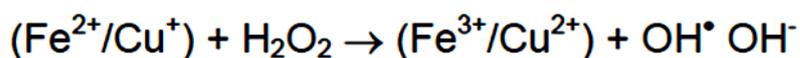


Fonte: Adaptado de Ames et al., 1993.

Por outro lado, o estresse oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio entre a geração de EROs e as defesas antioxidantes, ocasionando um potencial dano oxidativo (D'ÁVILA, 2008). Nesse sentido, apesar do $\text{O}_2^{\bullet -}$ não poder atacar diretamente o DNA, lipídios e proteínas, em condições elevadas o mesmo pode causar a mobilização de ferro a partir da ferritina e também atacar o sítio ativo de diversas enzimas, causando sua inativação acompanhada da liberação de ferro (HALLIWELL, 2001; TURI et al., 2004). Por ser um radical livre e, por conseguinte, muito reativo, deve ser removido rapidamente dos tecidos pela reação da dismutação realizada pela enzima superóxido dismutase (SOD), em que dois ânions superóxido reagem entre si, sendo um oxidado a oxigênio e outro reduzido a H_2O_2 (BOWLER; CRAPO, 2002; FORMAM; TORRES, 2002).

Conforme Halliwell (2001), possuindo alta reatividade o OH^{\bullet} é capaz de atacar e danificar todas as biomoléculas por reagir com quase todas as substâncias orgânicas, são gerados sempre que o H_2O_2 reagir com íons Cu^{+2} ou Fe^{+2} . A Figura 2 mostra esta reação que é conhecida como reação de Fenton (PIERRE; FONTECAVE, 1999; KANNO et al., 2003).

Figura 2 - Reação de Fenton.

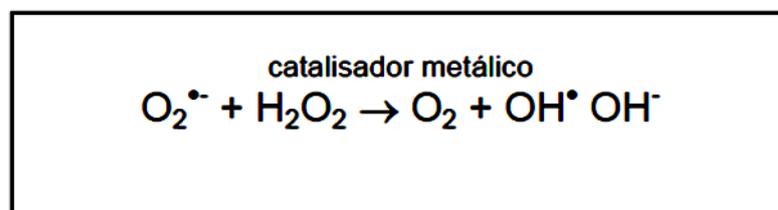


Fonte: Adaptado de Maier e Chan, 2002.

Essa não é a única forma de geração de radical hidroxil, também formado pela reação de Haber-Weiss (Figura 3), onde o peróxido de hidrogênio é reduzido formando o radical hidroxil mediante a transferência de um elétron do íon superóxido na presença de íons de metais catalíticos (GAETKE; CHOW, 2003). O radical

hidroxil é formado principalmente pela reação de Fenton, pois a reação de Haber-Weiss é bastante lenta (HALLIWELL; GUTTERIDJE, 1999).

Figura 3 - Reação de *Haber-Weiss*.



Fonte: Adaptado de Marks et al., 1996.

Outra espécie reativa que causa dano celular é o NO, produzido no organismo principalmente pela ação da enzima óxido nítrico sintase, contudo o NO não é suficientemente reativo para atacar o DNA diretamente, mas pode reagir com o radical ânion superóxido, gerando peroxinitrito (NOO⁻), um oxidante potente, causador de danos a muitas moléculas biológicas, inclusive aos grupos sulfidril da proteínas (VASCONCELOS et al., 2007).

A membrana, nesse contexto, é um dos componentes celulares mais atingidos por EROs em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Conseqüentemente há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (BARRICHELO; MARTINS; REINKE, 2005). Além disso as proteínas também sofrem reações oxidativas iniciadas pelas EROs, que levam a alterações nas suas estruturas e nos seus estados conformacionais (ALDRED; GRIFFITHS, 2004). Processos como fragmentação, agregação, além da maior susceptibilidade à proteases, exemplificam algumas das ações dos radicais livres sobre as proteínas (YU, 1994). Enquanto ao DNA o aumento de EROs pode causar dano através do ataque químico direto (como por exemplo, a ação sobre as bases do DNA) e/ou através de mecanismos indiretos, como por exemplo, a ação das EROs sobre enzimas que replicam ou reparam o DNA. Todavia, quando o O₂⁻, o NO ou o H₂O₂ se encontram em níveis fisiológicos, estes não reagem com as bases do DNA ou do RNA, ou com a ribose ou desoxirribose em razões significativas (BROZMANOVA; DUDÁS; HENRIQUES, 2001). Em relação ao OH⁻, este na

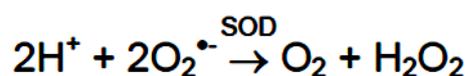
presença do DNA, é capaz de gerar vários produtos, uma vez que ele ataca açúcares, purinas e pirimidinas (HALLIWELL; GUTTERIDJE, 1999).

Para evitar a formação, e reparar os danos oxidativos em tecidos e macromoléculas, todos os organismos de vida aeróbica possuem um complexo sistema de defesas antioxidantes (MOLINA et al., 2003). Definem-se como “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, significativamente retarda ou previne a oxidação desse substrato”, sendo enzimáticos ou não enzimáticos (ATOUI et al., 2005).

As enzimas de defesa antioxidante operam como um sistema coordenado, balanceado, e atuam juntamente com outros antioxidantes ditos não-enzimáticos a fim de proteger o organismo contra a injúria celular causada pelo estresse oxidativo. Este complexo de sistema antioxidante enzimático é constituído por SOD, catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) (KUMAR; SHANMUGASUNDARAM, 2004).

A SOD é uma enzima presente em todos os organismos aeróbios, que tem como papel biológico catalisar a dismutação de O_2^- em O_2 e H_2O_2 (Figura 4) (FRIDOVICH, 1997). Esta reação pode ocorrer de modo espontâneo em pH fisiológico, porém quando a SOD está presente, a velocidade desta reação é 104 vezes maior (YU, 1994).

Figura 4 - Reação de dismutação do radical superóxido.

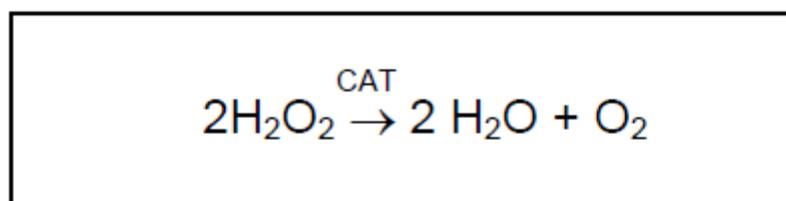


Fonte: Adaptado de Forman e Torres, 2002.

A CAT está principalmente localizada em organelas subcelulares conhecidas como peroxissomas, que contêm várias enzimas produtoras de H_2O_2 , e também no citosol (WARD; PETERS, 1995). Está presente nos principais órgãos do corpo, estando principalmente concentrada no fígado. Alguns órgãos como o coração, músculo esquelético e cérebro contêm níveis mais baixos de CAT do que o fígado, por exemplo, e estão, portanto, mais expostos aos danos provocados pelos radicais livres (HALLIWELL; GUTTERIDJE, 1999).

Sua função é controlar os níveis de H_2O_2 , pois é responsável pela sua degradação: transforma em água e oxigênio o H_2O_2 , formado na dismutação do O_2^- (Figura 5) (BABIOR, 1997).

Figura 5 - Reação de decomposição do H_2O_2 ao O_2 pela enzima catalase.



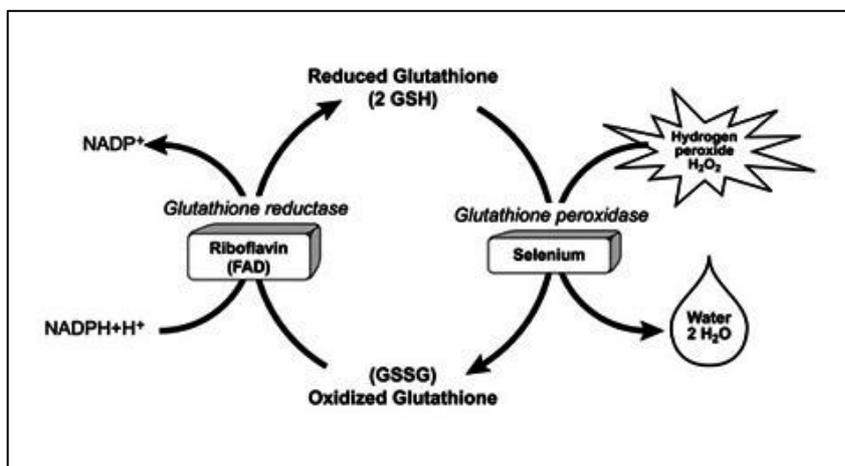
Fonte: Adaptado de Forman e Torres, 2002.

Presente em animais, plantas e muitas bactérias aeróbicas em concentrações intracelulares que estão frequentemente na faixa de milimolar, a GPx é uma outra forma de eliminar o H_2O_2 , atuando na remoção deste e de outros peróxidos, através do acoplamento de sua redução à água com a concomitante oxidação da glutatona reduzida (GSH) conforme demonstra a Figura 6 (SHAN; AW; JONES, 1990).

A enzima GPx catalisa a reação de redução do H_2O_2 , utilizando selênio como cofator enzimático. Sendo que a glutatona peroxidase mitocondrial responde por aproximadamente 60% da taxa de redução de H_2O_2 . A deficiência de glutatona está associada com disfunção mitocondrial generalizada conduzindo a danos celulares (NAVARRO; BOVERIS, 2007).

Estudos têm mostrado que além de uma produção aumentada de EROs, há também uma diminuição de antioxidantes, causando o estresse oxidativo em tempo precoce (12 e 24 horas) além de tardio (10 e 30 dias), após indução de sepse em modelo animal, e tais alterações correlacionam-se com déficits cognitivos como a perda de memória (CASSOL-JR et al., 2010).

Figura 6 - Sistema glutathione peroxidase/reductase.



Fonte: Barceloux, 1999.

1.5 METABOLISMO ENERGÉTICO

Tecidos com uma alta demanda energética tais como o cérebro, contêm uma grande quantidade de mitocôndrias, sendo assim mais suscetível a redução do metabolismo aeróbico. As mitocôndrias são organelas intracelulares que representam um papel crucial na produção de ATP, o principal combustível da célula na maioria dos processos que necessitam de energia (CALABRESE et al., 2001).

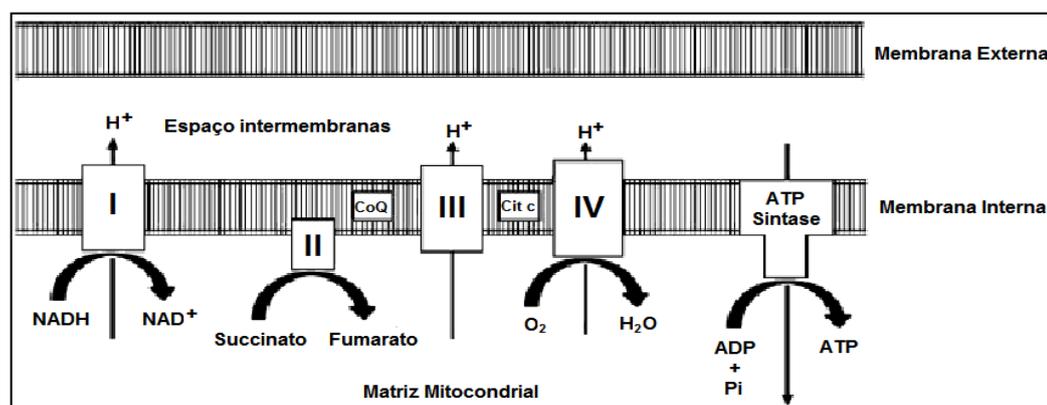
A fosforilação oxidativa mitocondrial é a principal via de produção de ATP, através da cadeia respiratória, composta por quatro complexos enzimáticos onde as unidades de transporte de elétrons translocam os prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana (Figura 7). A dissipação desses prótons acontece através da síntese catalítica de formação de ATP pela fosforilação de adenosina difosfato (ADP) (BOEKEMA; BRAUN, 2007).

EROs são geradas como subprodutos das reações desse processo. A cadeia respiratória mitocondrial constitui a principal fonte intracelular de EROs na maioria dos tecidos, liberando pequenas quantidades de O_2 e H_2O_2 através da auto-oxidação (TURRENS, 2003). Sendo assim, uma alteração no fluxo de elétrons na cadeia respiratória provocaria um escape de elétrons, resultando em um aumento na geração de radicais livres e o DNA mitocondrial um alvo para os danos, uma vez que está próximo da cadeia transportadora de elétrons. Tornando-se um ciclo vicioso: lesão do DNA mitocondrial afetaria a função da cadeia respiratória, levando

à geração de mais radicais livres que, por sua vez, provocariam lesão adicional ao DNA mitocondrial (BANDY; DAVISON, 1997).

Estudos mostram que a disfunção mitocondrial resulta de um mau funcionamento da cascata bioquímica sugerindo ser um importante fator na patogênese de muitas doenças (FERREIRA; MATSUBABA, 1997). Sabe-se que o sistema de fosforilação oxidativa gera radicais livres e a cadeia de transporte de elétrons está vulnerável a dano por estes (HORN; BARRIENTOS, 2008). O dano oxidativo induzido pelo estresse pode ser causa ou consequência da disfunção mitocondrial (BOEKEMA; BRAUN, 2007).

Figura 7 - Cadeia respiratória mitocondrial.

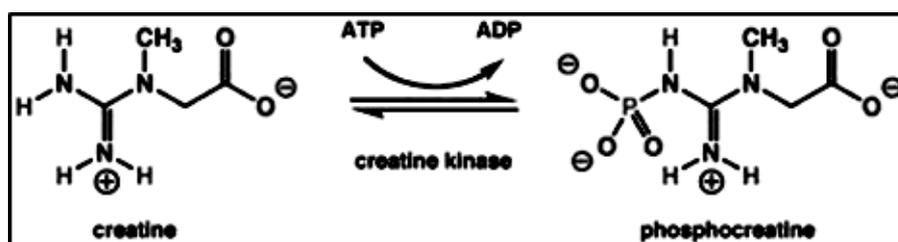


Fonte: Rezin, 2008.

Outra forma de produção de ATP é a partir da enzima creatina quinase (CK). A CK consiste de um grupo de isoenzimas com um papel central no metabolismo energético, principalmente para tecidos com alta demanda energética, como cérebro, músculo cardíaco e esquelético, onde funciona como um efetivo sistema de tampão para os níveis celulares de ATP. A CK catalisa a transfosforilação reversível entre ATP e creatina a ADP e fosfocreatina, auxiliando a manter os níveis dos substratos fosforilados (Figura 8). Durante a excitação nervosa e neuromuscular, o sistema creatina/fosfocreatina é necessário atuando tanto como um tampão de ATP nas células quanto como um sistema de transporte entre os locais de produção e consumo de ATP pelas ATPases para evitar grandes oscilações nos níveis de ATP/ADP celulares nesses tecidos excitáveis (WALLIMANN et al., 1992).

Quando os complexos respiratórios estão com a atividade diminuída ou aumentada, a produção energética é alterada (CROUSER, 2004). Assim torna-se importante avaliar a atividade da creatina quinase para verificar se há uma compensação energética cerebral.

Figura 8 - O sistema creatina quinase/fosfocreatina/creatina como sistema de tamponamento dos níveis de ATP celular.



Fonte: Elaboração da autora, 2013.

Estudos demonstram que a hipóxia e um número de mediadores implicados na sepse e na resposta inflamatória sistêmica associada prejudicam diretamente a função mitocondrial. Evidências suportam um papel-chave do NO (e seus metabólitos), que produzido em excesso considerável em pacientes com sepse pode reagir com a maioria dos componentes da cadeia de transporte de elétrons, na disfunção mitocondrial (HARROIS; HUET; DURANTEAU, 2009; GARRABOU et al., 2012). Sendo assim, busca-se mais estudos sobre os efeitos da sepse sobre a cadeia respiratória mitocondrial, pois a deficiência no funcionamento normal desta leva a uma rápida queda na produção de energia, justificando a morte celular (CROUSER, 2004).

1.6 COMPOSTOS DE SELÊNIO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

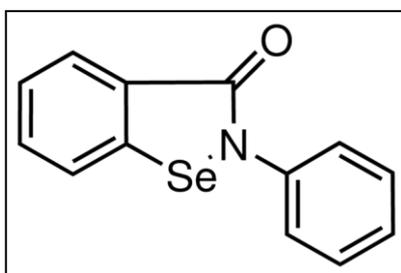
O selênio é um elemento químico não-metal e essencial na dieta, sendo incorporado em proteínas como selenocisteína de aminoácidos. Encontrado principalmente nas seguintes fontes alimentares: castanha-do-pará, germe de trigo, salmão e frango (Mahan et al. 2005). Propriedades físico-químicas e bioquímicas do selênio tem resultado de características únicas redox de selenocisteína e sua utilização em enzimas antioxidantes. Neste contexto é responsável pela redução dos

metabólitos de oxigênio reativos, ajudando a manter a integridade da membrana, reduzindo o dano oxidativo a lípidos, lipoproteínas e DNA.

Durante os últimos anos, um grande esforço tem sido dirigido para a síntese de compostos de organoselênio estáveis que possam ser usados como antioxidantes (NOGUEIRA; ROCHA, 2011). A efetividade de compostos de selênio se deve ao fato de que apresentam atividade semelhante a enzima GPx, que conforme citado anteriormente, possui selênio como cofator enzimático e catalisa a redução de hidroperóxidos e peroxinitritos por radicais livres, protegendo assim as células contra o estresse oxidativo (BRENNEISEN; STEINBRENNER, 2005; ROOS et al., 2009).

O ebselen (EB) [2-fenil-1,2-benzoisoselenazol-3-(2H)-one] com fórmula química ($C_{13}H_9NOSe$) (Figura 10), é um composto lipídico seleno-orgânico solúvel em solventes orgânicos que reduz hidroperóxidos e lipoperóxidos por mimetizar a atividade da GPx, possuindo um importante efeito antioxidante e antiinflamatório (ANTONY; BAYSE, 2011; PAWLAS; MALECKI, 2007). Tem-se visto que o EB possui papel neuroprotetor decorrente da atenuação de dano oxidativo ao DNA causado por lesões isquêmicas (HE et al., 2007; TAKASAGO et al., 1997), além de mostrar-se efetivo na diminuição do dano neuronal induzido por álcool e doença desmielinizante (JOHNSEN-SORIANO et al., 2007; MAZZANTI et al., 2007).

Figura 9 - Estrutura química do EB.

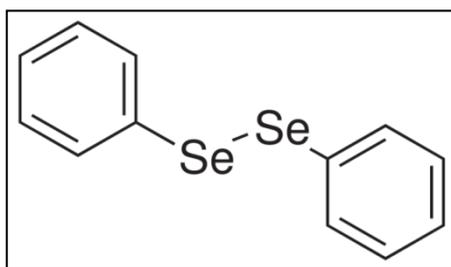


Fonte: Elaboração da autora, 2013.

O disseleneto de difenila (DD) com fórmula química ($C_{12}H_{10}Se_2$) (Figura 11), tem merecido destaque na literatura desde a década de 80 principalmente por assim como o EB ser um mimético da enzima glutathione peroxidase (SPECTOR et al., 1989). Nesse contexto, diversos trabalhos têm apresentado o DD como um bom agente antioxidante na redução da peroxidação de lípidios provocada por diversos

agentes em diferentes tecidos (MEOTTI et al., 2004; SANTOS et al., 2004). Dados da literatura também indicam várias propriedades farmacológicas, tais como neuroprotetor conforme, Barbosa et al. (2006) e Borges et al. (2006), hepatoprotetor segundo, Prauchner, Prestes e Rocha (2011) e Silva et al. (2012) e na diminuição do dano pulmonar agudo (LUCHESE et al., 2012).

Figura 10 - Estrutura química do DD



Fonte: Elaboração da autora, 2013.

Além das vias pelas quais EB e DD exercem efeitos antioxidantes citados anteriormente, Dobrachinski e outros (2012) relatam a ação de tais compostos na diminuição do dano oxidativo causado pelo aumento de glutamato na fenda sináptica, induzido por ácido quinolínico. Nesse sentido, sabe-se que na sepse tem-se verificado que antagonizando os receptores NMDA com o MK-801, ou através da administração de guanosina responsável pelo aumento da recaptção de glutamato, ocorre a diminuição do dano oxidativo em diferentes regiões cerebrais (FORDER; TYMIANSKI, 2009; PETRONILHO et al., 2012).

1.7 MODELO ANIMAL DE SEPSE

A sepse é uma síndrome complexa e terapeuticamente desafiadora, na qual diversos sistemas orgânicos estão interligados e desequilibrados. Vários modelos experimentais têm sido desenvolvidos para os estudos dos aspectos fisiopatológicos e das consequências sistêmicas da sepse, assim como para a investigação de agentes potencialmente terapêuticos e seus mecanismos de ação. Para esta proposta, deve-se utilizar um modelo animal que reproduza a vasodilatação, hipotensão, aumento no débito cardíaco, resposta ao tratamento e mortalidade vistos em pacientes sépticos. Tem-se utilizado para tal finalidade o modelo de sepse abdominal, sepse cutânea ou sepse induzida pela administração

de LPS ou TNF- α . Porém os modelos que induzem peritonite são mais amplamente utilizados. A peritonite pode ser induzida por inoculação direta de bactérias ou conteúdo fecal na cavidade peritoneal e, entretanto o modelo mais aceito na literatura, e que parece simular mais adequadamente o quadro clínico de sepse é chamado de ligação e perfuração cecal (CLP) (DEITCH, 2005; RITTIRSCH; HOESEL; WARD, 2007). A técnica CLP baseia-se na ligação do ceco logo abaixo da válvula íleo cecal, perfuração do ceco com tamanho padronizado e liberação do conteúdo fecal para a cavidade peritoneal, conforme classicamente descrito por Wichterman, Baue e Chaudry (1980).

A técnica CLP apresenta vantagens como relativa simplicidade, reprodutibilidade e possibilidade de controlar o grau de contaminação bacteriana na cavidade peritoneal, e conseqüentemente, a mortalidade, pela mudança do tamanho da agulha e/ou número de perfurações realizadas no ceco. Em contrapartida, variabilidades na mortalidade podem ser encontradas mesmo quando protocolos iguais são usados devido a fatores aos quais, na maioria das vezes, não são considerados como, por exemplo, diferenças no tamanho da incisão na pele e músculo, no comprimento ligado do ceco e volume de conteúdo fecal extravasado para a cavidade peritoneal (DEITCH, 2005; RITTIRSCH; HOESEL; WARD, 2007). Por isso, a padronização do procedimento de indução de sepse polimicrobiana por CLP tem relevante importância na consistência e reprodutibilidade dos resultados.

2 JUSTIFICATIVA

Considerando que a sepse é uma importante causa de mortalidade e de lesões neurológicas são necessários estudos que descubram que mecanismos causam esses danos e quais medicamentos podem ser utilizados para diminuir tais lesões. Nesse sentido sabendo do potencial antioxidante de compostos orgânicos de selênio e que a disfunção cerebral associada à sepse pode ser decorrente do estresse oxidativo causado por radicais livres investigaremos nesse contexto, o papel de dois compostos orgânicos de selênio em diversos parâmetros bioquímicos no cérebro de ratos submetidos à sepse que poderão ser potencialmente úteis no tratamento para o pronunciado dano neurológico apresentado pelos pacientes afetados por essa doença. A possibilidade de diminuir a mortalidade por sepse e reduzir os gastos com internação em UTIs, além das sequelas tardias destes pacientes justificam a necessidade de maior investimento no estudo desta patologia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos antioxidantes da administração de compostos orgânicos de selênio sob parâmetros de dano oxidativo e mitocondrial no cérebro de ratos submetidos à sepse.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de EB e DD nos níveis de dano oxidativo em lipídios e proteínas no cérebro de ratos 12 e 24 horas após indução de sepse.
- Avaliar o efeito de EB e DD nos níveis da atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial (complexo I, II e IV) no cérebro de ratos 12 e 24 horas após indução de sepse.
- Avaliar o efeito de EB e DD sob a atividade da enzima CK no cérebro de ratos 12 e 24 horas após indução da sepse.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo experimental com animais.

4.1.1 Bioética

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina/UNISUL (protocolo número 11.039.4.08.IV) e obedeceu aos Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (Principles of Laboratory Animal Care, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1996).

4.1.2 Animais

Foram utilizados Ratos Wistar machos, de 60 dias de idade, pesando aproximadamente 250 a 350g procedentes do Biotério da Universidade do Sul de Santa Catarina mantidos em temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) e ciclos de luz artificial (12 horas claro/escuro). Receberam ração comercial padronizada para ratos de laboratório e água *ad libitum*.

Durante os experimentos, os animais foram manipulados por pessoas qualificadas para tratá-los de maneira humanitária evitando dores e estresse desnecessários. Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina sob estrita obediência às prescrições científicas, de acordo com as normas do Conselho de Medicina Veterinária, sempre com a presença de um Médico Veterinário.

4.1.3 Indução de sepse

A sepse intra-abdominal foi produzida usando a técnica CLP conforme previamente descrito (FINK, HEARD, 1990). Brevemente, os ratos foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg), sendo submetidos à laparotomia com incisão mediana abdominal. O ceco foi ligado logo abaixo da junção íleo-cecal com fio seda 3-0, mantendo assim a continuidade intestinal. O ceco foi perfurado com uma agulha número 14 na sua face antimesentérica, e

gentilmente comprimido até a extrusão de conteúdo fecal. Os planos cirúrgicos foram fechados e os ratos observados em caixa de recuperação por 2 horas. Como controle utilizamos animais submetidos à laparotomia, com manipulação do ceco, mas sem ligação ou perfuração (sham). Os grupos sepse e sham receberam reposição volêmica, realizada com salina, 50 mL/kg, imediatamente e 12 horas após a cirurgia e ceftriaxona 30 mg/kg e 25 clindamicina mg/kg por via subcutânea a cada 6 horas.

4.1.4 Tratamentos e obtenção das amostras

Os animais foram divididos em 4 grupos, com n de 15 animais por grupo divididos em: sham + veículo; CLP + veículo; CLP + DD (50 mg/kg) segundo Acker e outros (2009) e CLP + EB (50 mg/kg) conforme Kono e outros (2001).

Como os compostos são lipossolúveis o veículo utilizado foi a base de óleo. Os compostos assim como o óleo de soja, foram administrados intragastricamente através de gavagem após a cirurgia.

Nos tempos de 12 e 24 horas após a cirurgia os animais foram mortos por decaptação e as estruturas cerebrais foram dissecadas e divididas em hipocampo, córtex, córtex pré-frontal, estriado e cerebelo e armazenados em freezer para os experimentos de determinação de parâmetros de dano oxidativo e mitocondrial.

4.1.5 Testes bioquímicos

4.1.5.1 Determinação do dano oxidativo

Foi avaliado o dano oxidativo (em lipídios e proteínas) onde como índice de peroxidação lipídica foi medido o nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como previamente descrito (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990). Brevemente as amostras foram precipitadas com ácido tricloroacético a 10%, logo é adicionado ácido tiobarbitúrico a 0,67%. Foi realizada a leitura em espectrofotometro em absorvância de 535 nanômetros usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados foram expressos em malondialdeído equivalente (nmol/mg de proteína).

Foi avaliado o dano oxidativo a proteínas pela determinação do nível de grupos carbonilas, com base na reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH) (REZNICK; PACKER, 1994). Inicialmente as proteínas foram precipitadas com adição de ácido tricloroacético a 20%, sendo dissolvidas em dinitrofenilhidrazina. A absorvância foi lida a 370 nanômetros, sendo os resultados expressos em nmol/mg de proteína.

4.1.5.2 Determinação dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial.

As estruturas cerebrais foram homogeneizadas (1:10, p/v) em tampão SETH, pH 7,4. O homogeneizado foi centrifugado a 800 g por 10 minutos e o sobrenadante armazenado a -70°C para determinação da atividade enzimática. A atividade do complexo I (através da avaliação da NADH desidrogenase) foi determinada de acordo com Cassina e Radi, (1996). O complexo II foi avaliado pela atividade do succinato de acordo com Fischer e Jasen (1985), enquanto o complexo IV foi determinado a partir da atividade do citocromo c oxidase de acordo com Rustin e Munnich (1994).

4.1.5.3 Determinação da atividade da creatina quinase (CK)

A atividade da CK foi determinada em homogeneizado dos tecidos cerebrais (1:10, p/v) em solução salina. O meio de incubação para dosagem da CK é composto por fosfocreatina, ADP e glutathiona reduzida. A formação de CK foi medida por um método colorimétrico de acordo com Hughes, (1962). As frações citosólica e mitocondrial da CK foram separadas por centrifugação. Expressa em unidade/min.mg proteína.

4.1.5.4 Determinação de proteínas totais

Todas as mensurações bioquímicas foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas com albumina bovina como padrão, expressa em mg. (LOWRY et al., 1951).

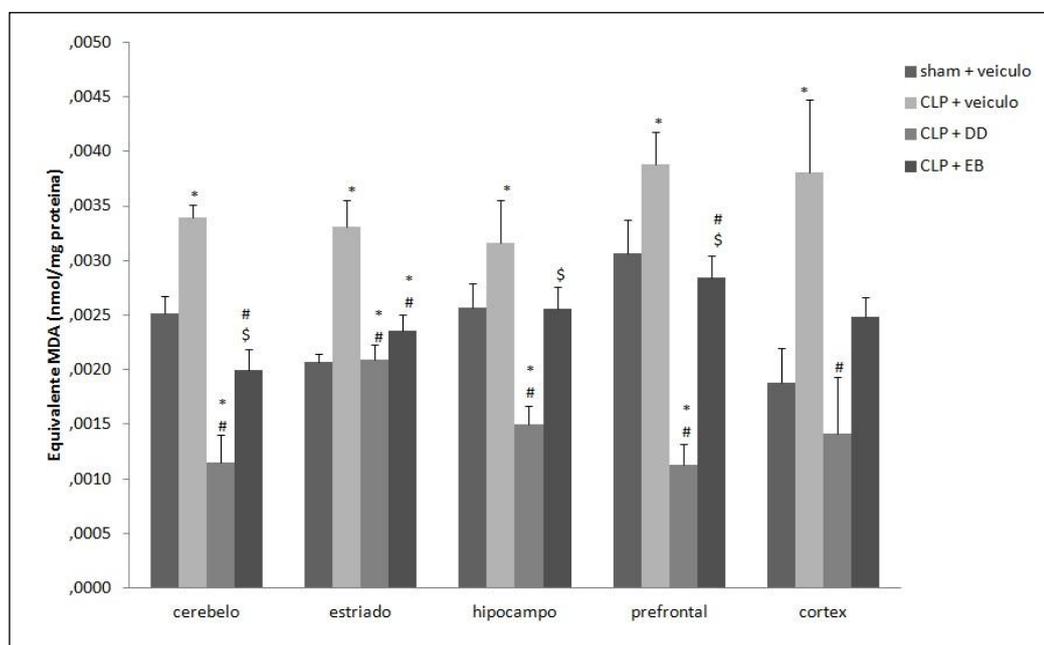
4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram apresentados como média e desvio padrão. Dados bioquímicos foram analisados através de ANOVA por análise de variância de uma via e *post hoc Tukey*. As análises estatísticas foram feitas por SPSS versão 20.0, com diferenças significativas quando o valor de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

Nossos resultados iniciais mostram através do gráfico 1 o dano oxidativo em lipídios no cerebelo, estriado, hipocampo, pré-frontal e córtex após 12 horas da indução de CLP. O DD se mostrou eficaz na diminuição dos danos em todas as estruturas cerebrais avaliadas. Enquanto o EB foi eficaz no cerebelo, estriado e pré-frontal e apresentou níveis de peroxidação lipídica maiores que o DD no cerebelo, hipocampo e pré-frontal.

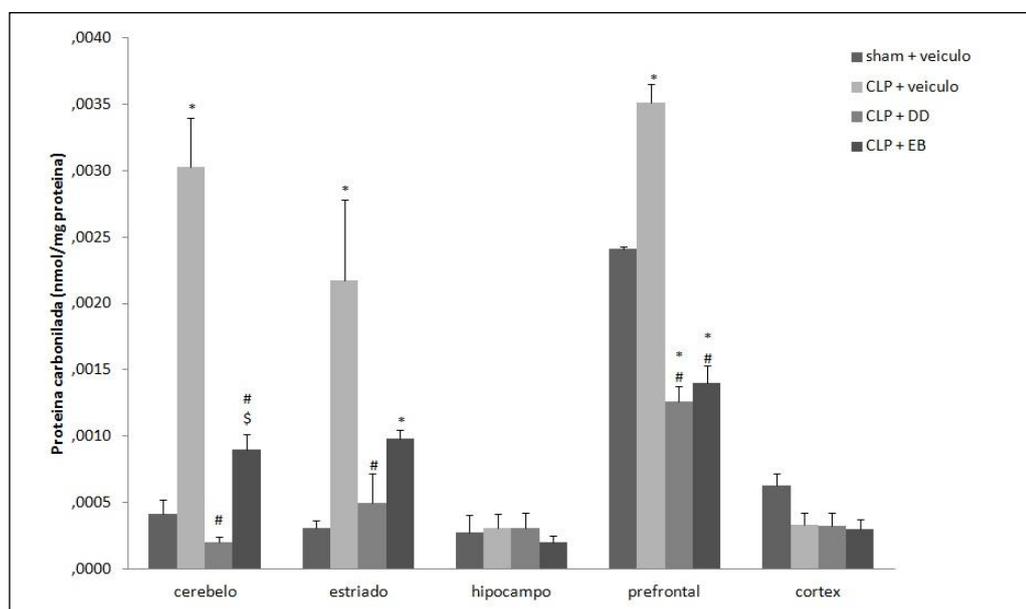
Gráfico 1 - Níveis de TBARS em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 12 horas após a sepse.



Dados são expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ em relação ao grupo sham+veiculo, # $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP+ veiculo e \$ $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP + DD.
Fonte: Elaboração da autora, 2013.

Em relação ao dano oxidativo em proteínas após 12 horas da indução do CLP foram observados níveis aumentados no cerebelo, estriado e pré-frontal. E tanto DD quanto EB se mostraram eficazes na redução dos danos em tais regiões cerebrais (Gráfico 2).

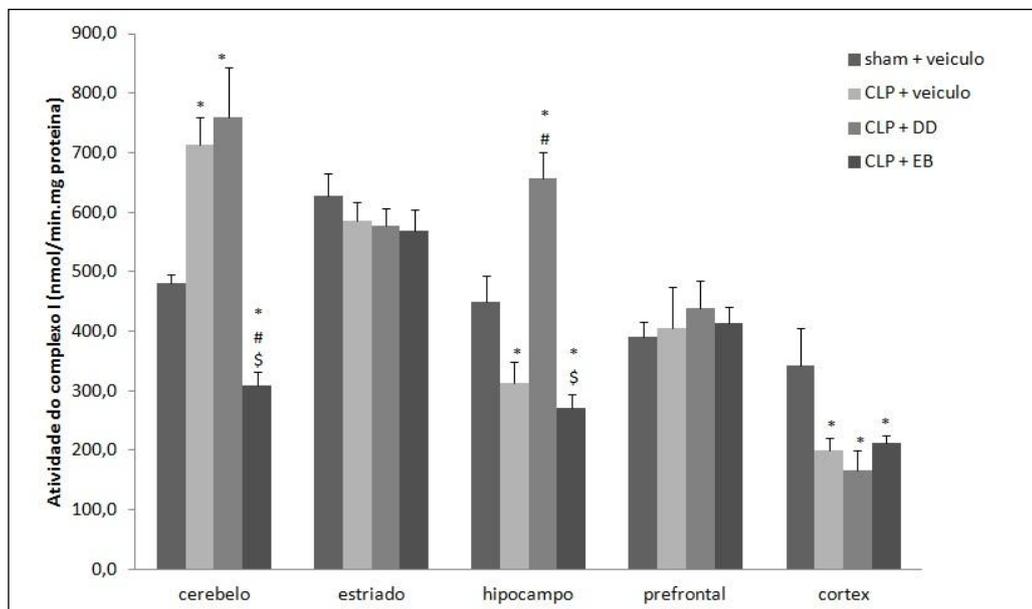
Gráfico 2 - Níveis de proteínas carboniladas em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 12 horas após a sepse.



Dados são expressos como media \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ em relação ao grupo sham+veiculo, # $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP+ veiculo e \$ $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP + DD.
Fonte: Elaboração da autora, 2013.

Ainda em 12 horas, avaliamos a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial (Gráfico 3), onde o modelo CLP mostrou diminuição da atividade do complexo I no hipocampo e no córtex enquanto a administração de DD aumentou a atividade de tal complexo no hipocampo, não havendo resposta para o tratamento com EB.

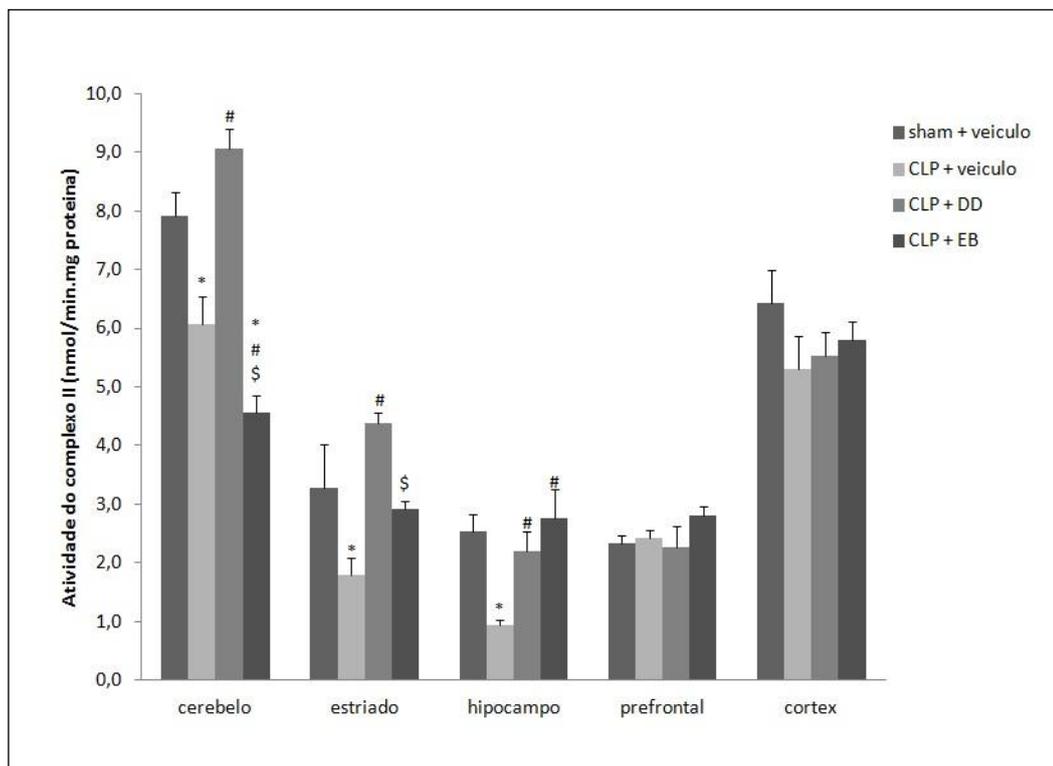
Gráfico 3 - Níveis da atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 12 horas após a sepse.



Dados são expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ em relação ao grupo sham+veiculo, # $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP+ veiculo e \$ $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP + DD.
Fonte: Elaboração da autora, 2013.

Já para a atividade do complexo II houve uma diminuição nos níveis da atividade do complexo no cerebelo, estriado e hipocampo, sendo que a administração de DD mostrou aumento na atividade nas três estruturas e o EB apenas no hipocampo conforme demonstrado no gráfico 4.

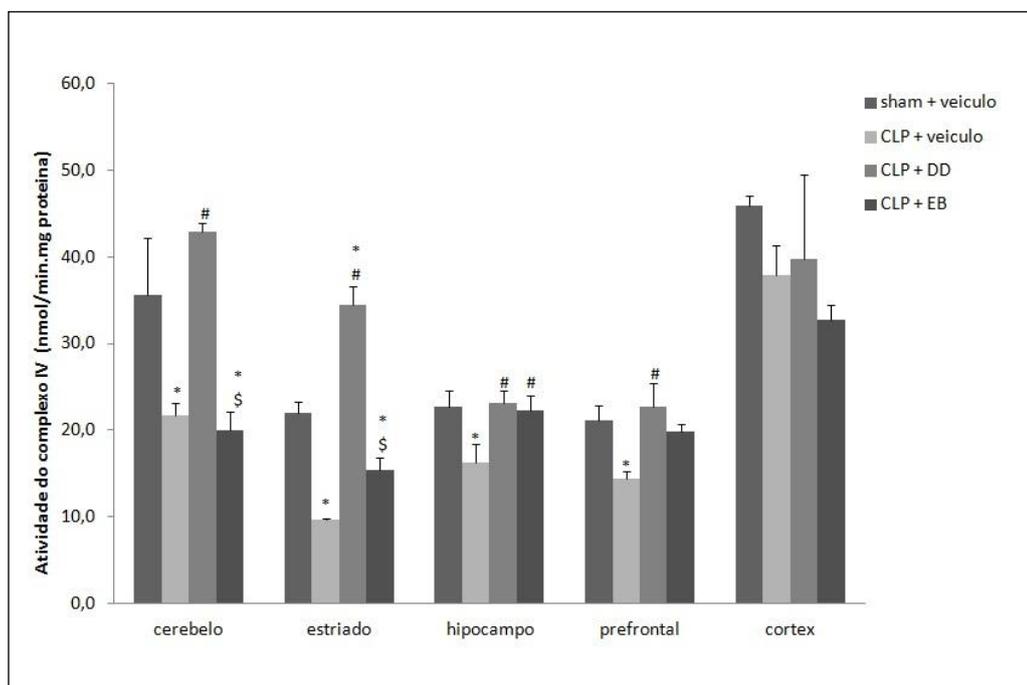
Gráfico 4 - Níveis da atividade do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 12 horas após a sepse.



Dados são expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ em relação ao grupo sham+veiculo, # $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP+ veiculo e \$ $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP + DD.
Fonte: Elaboração da autora, 2013.

Em relação à atividade do complexo IV observamos uma diminuição no grupo CLP no cerebelo, estriado, hipocampo e pré-frontal. A administração de DD aumentou a atividade em todas as regiões enquanto o EB apenas no hipocampo (Gráfico 5).

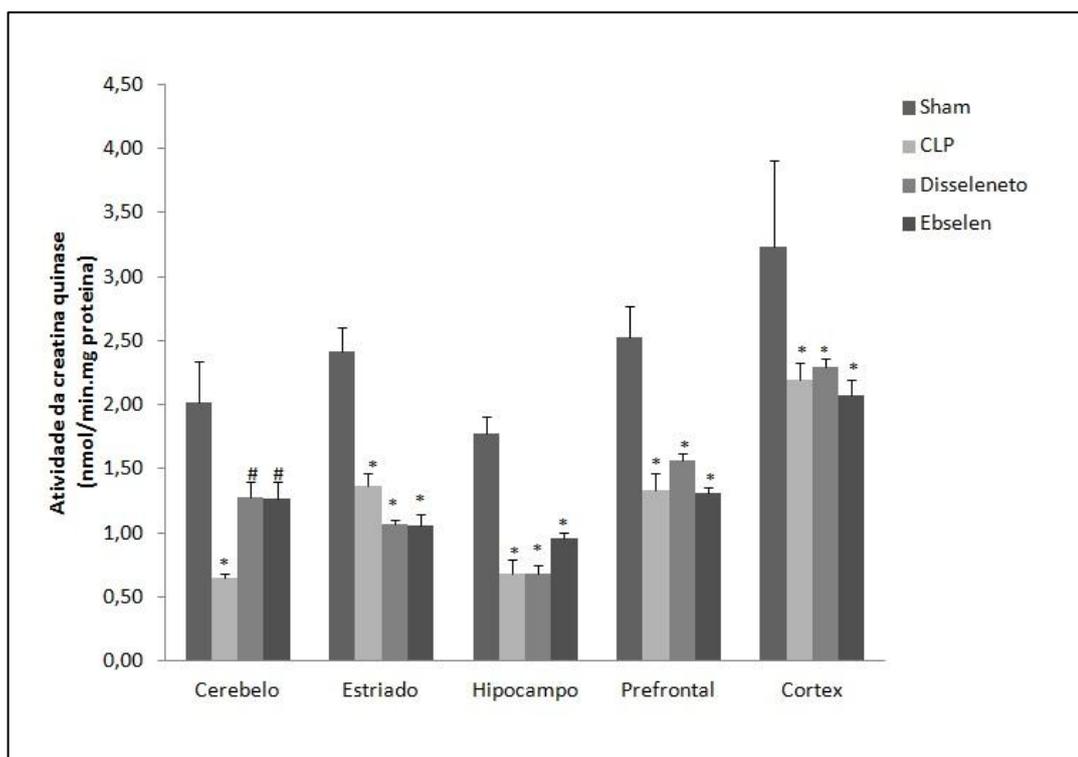
Gráfico 5 - Níveis da atividade do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 12 horas após a sepse.



Dados são expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ em relação ao grupo sham+veiculo, # $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP+ veiculo e \$ $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP + DD.
Fonte: Elaboração da autora, 2013.

Finalmente para o tempo de 12 horas após indução da sepse observamos de acordo com o gráfico 6 a diminuição da atividade da enzima CK em todas as estruturas estudadas. Sendo que DD e EB alteraram significativamente tais níveis somente no cerebelo.

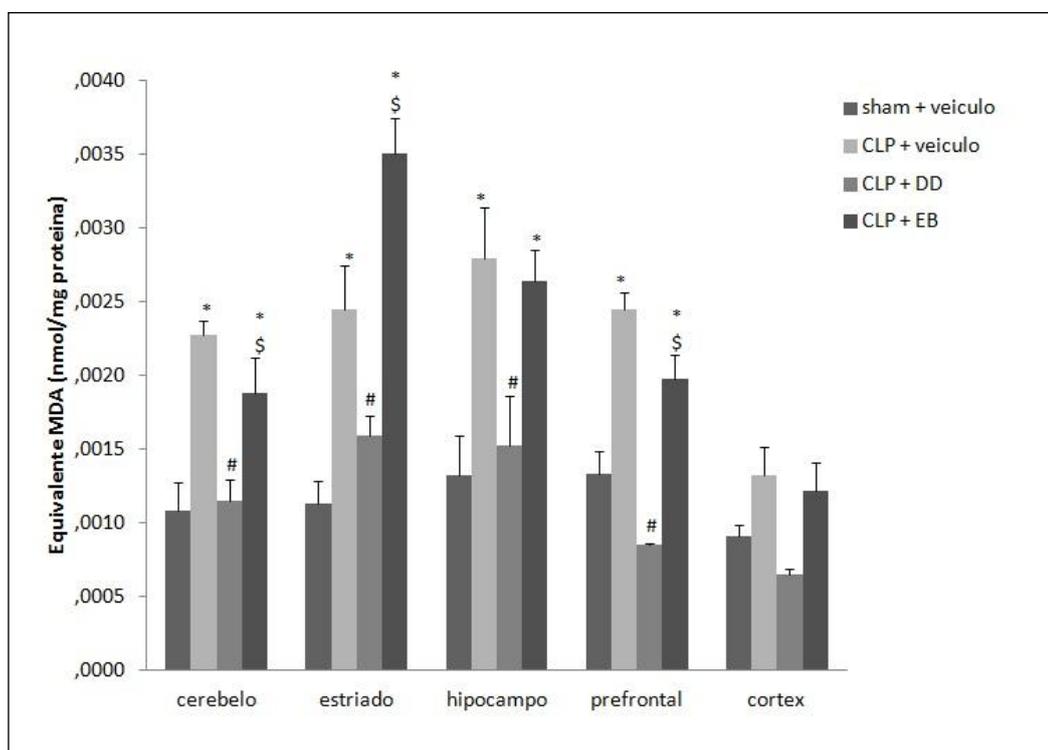
Gráfico 6 - Níveis da atividade da CK em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 12 horas após a sepse.



Dados são expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ em relação ao grupo sham+veículo, # $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP+ veículo e \$ $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP + DD.
Fonte: Elaboração da autora, 2013.

Quando avaliados os parâmetros anteriormente citados no tempo de 24 horas após CLP verificamos inicialmente que conforme o gráfico 7 houve um aumento no dano em lipídios em diferentes estruturas. Em todos os casos apenas o DD se mostrou eficaz na diminuição dos danos, enquanto o EB aumentou o dano que foi atenuado através da administração de DD.

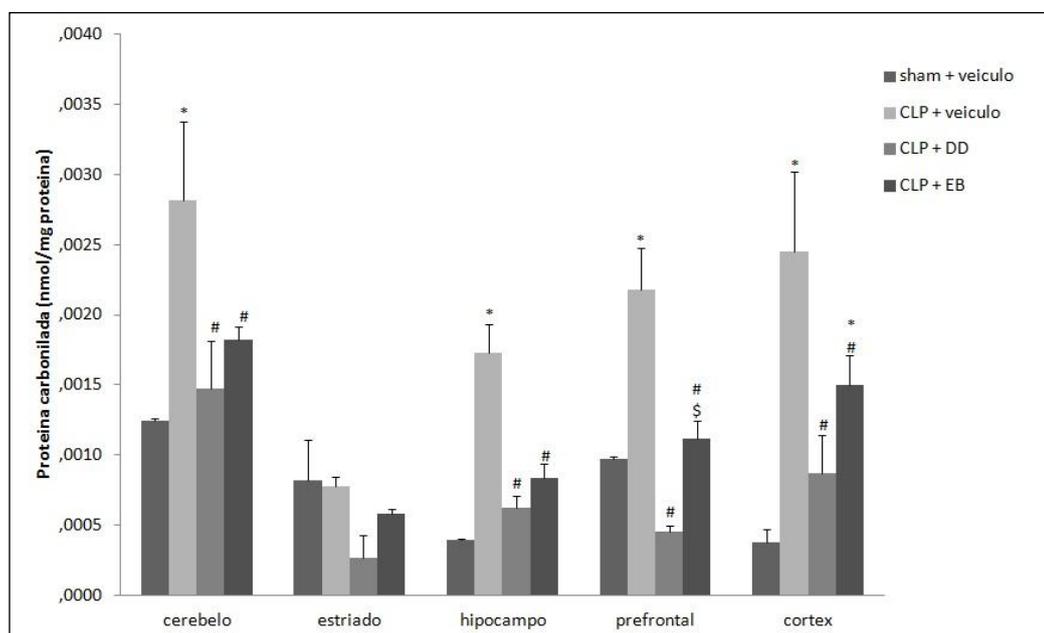
Gráfico 7 - Níveis de TBARS em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 24 horas após a sepse.



Dados são expressos como media \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ em relação ao grupo sham+veiculo, # $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP+ veiculo e \$ $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP + DD.
Fonte: Elaboração da autora, 2013.

Em relação ao dano a proteínas (Gráfico 8) observamos um aumento no cerebelo, hipocampo, pré-frontal e córtex no grupo CLP em relação ao sham. E em todos os casos tanto a administração de DD como de EB reduziram a formação de proteínas carboniladas.

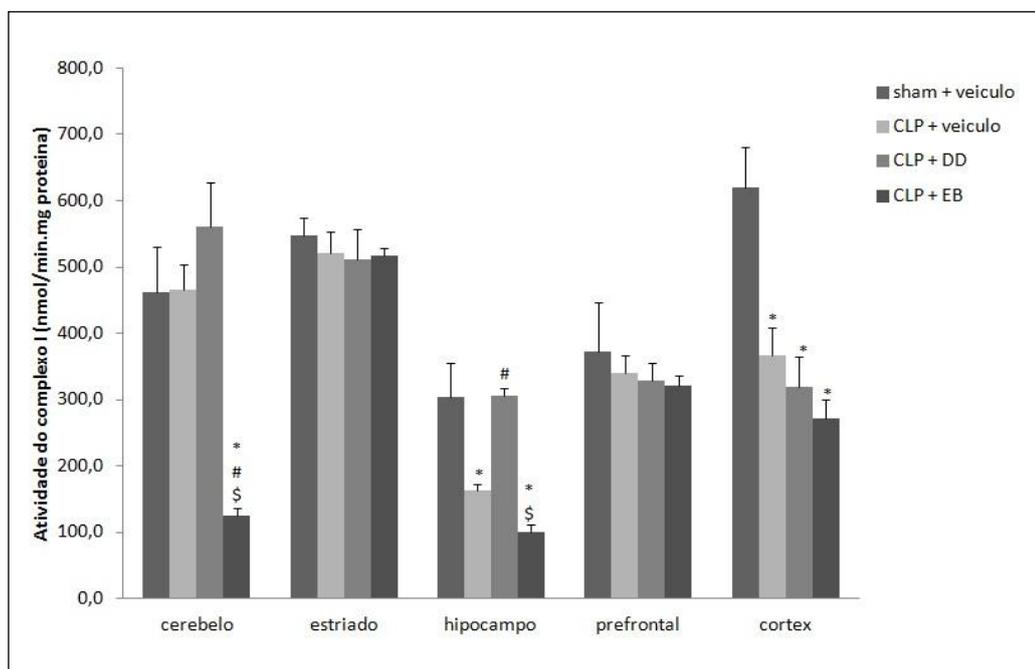
Gráfico 8 - Níveis de proteínas carboniladas em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 24 horas após a sepse.



Dados são expressos como media \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ em relação ao grupo sham+veiculo, # $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP+ veiculo e \$ $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP + DD.
Fonte: Elaboração da autora, 2013.

Na avaliação dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial para o tempo de 24 horas após a cirurgia, verificamos em relação a atividade do complexo I que apenas no hipocampo teve sua atividade diminuída devido a indução de sepse e os compostos de selênio não revertem tal dano (Gráfico 9).

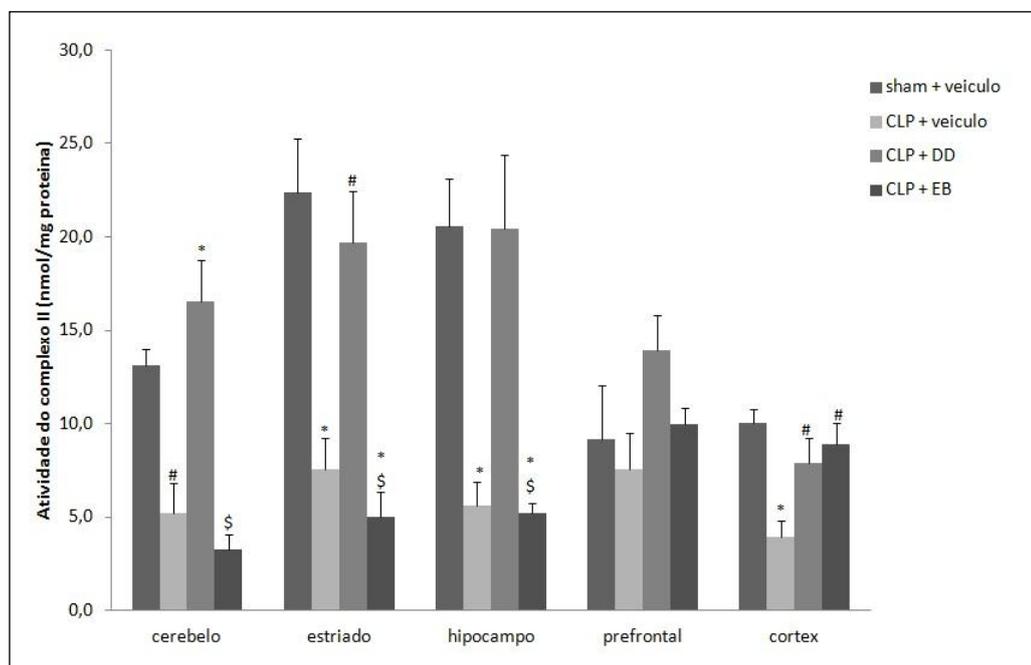
Gráfico 9 - Níveis da atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial em estruturas cerebrais de ratos submetidos a sepse e tratados com DD ou EB 24 horas após a sepse.



Dados são expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ em relação ao grupo sham+veiculo, # $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP+ veiculo e § $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP + DD.
Fonte: Elaboração da autora, 2013.

Para a atividade do complexo II observou-se que a indução da sepse diminui tal parâmetro no cerebelo, estriado, hipocampo e córtex em contrapartida o DD aumentou a atividade em todas as regiões cerebrais e o EB apenas no córtex (Gráfico 10).

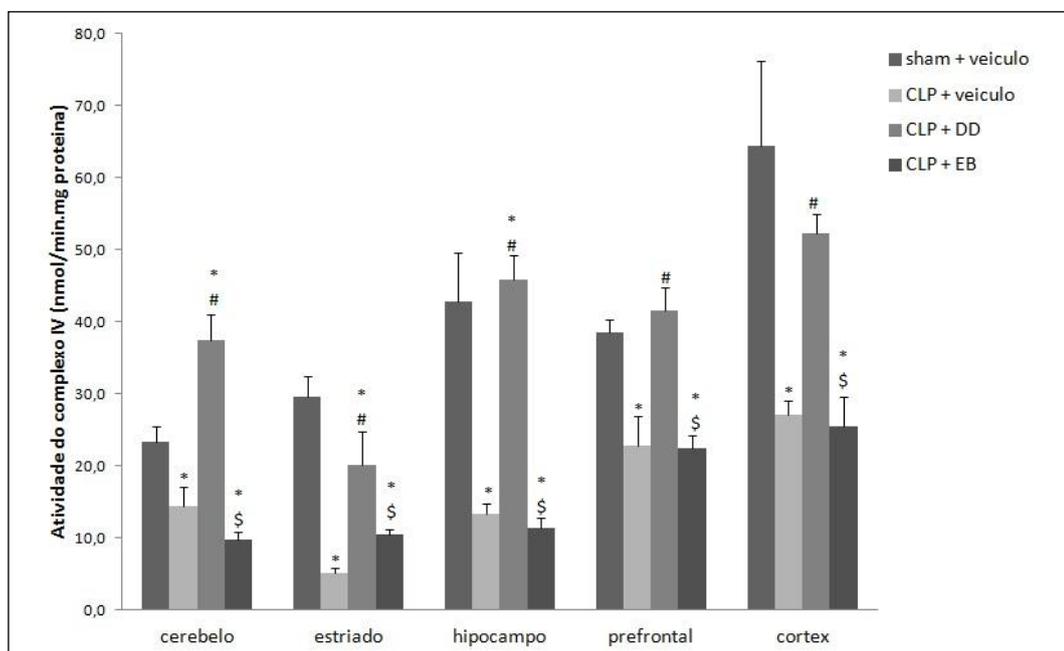
Gráfico 10 - Níveis da atividade do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 24 horas após a sepse.



Dados são expressos como media \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ em relação ao grupo sham+veiculo, # $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP+ veiculo e \$ $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP + DD.
Fonte: Elaboração da autora, 2013.

Conforme verificamos no gráfico 11, os ratos submetidos ao modelo CLP tiveram para o complexo IV sua atividade diminuída em todas as estruturas cerebrais estudadas. E todas mostraram um aumento da atividade devido a administração de DD o que não ocorreu com a administração de EB.

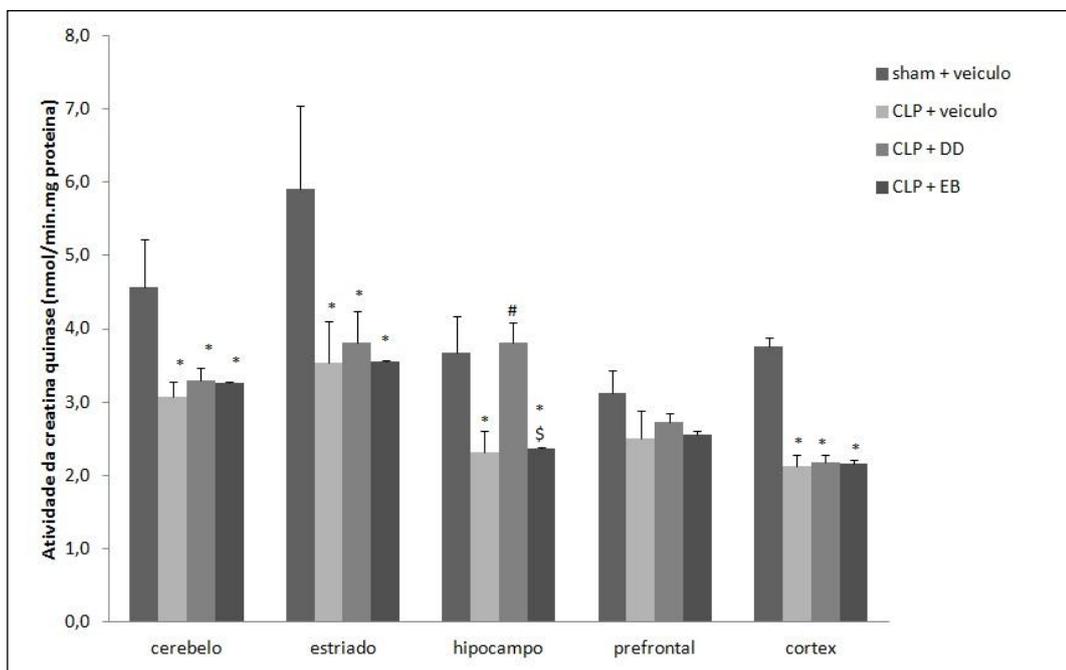
Gráfico 11 - Níveis da atividade do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 24 horas após a sepse.



Dados são expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ em relação ao grupo sham+veiculo, # $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP+ veiculo e \$ $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP + DD.
Fonte: Elaboração da autora, 2013.

Finalmente, de acordo com o gráfico 12, houve diminuição da atividade da CK 24 horas após a cirurgia no grupo CLP no cerebelo, estriado, hipocampo e córtex. No entanto, apenas no hipocampo a administração de DD aumentou tal atividade enquanto o EB não mostrou resposta.

Gráfico 12 - Níveis da atividade da CK em estruturas cerebrais de ratos submetidos à sepse e tratados com DD ou EB 24 horas após a sepse.



Dados são expressos como media \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ em relação ao grupo sham+veiculo, # $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP+ veiculo e \$ $p < 0.05$ em relação ao grupo CLP + DD.
 Fonte: Elaboração da autora, 2013.

6 DISCUSSÃO

Sepse severa está associada com disfunção de múltiplos órgãos incluindo disfunção cerebral chamada encefalopatia séptica. Sua fisiopatologia ainda não é totalmente entendida, mas vários mecanismos têm sido propostos e parece envolver danos celulares direto ao cérebro, disfunção mitocondrial e endotelial, distúrbios em neurotransmissores e alteração na BHE (SIAMI; ANNANE; SHARSHA, 2008).

Demonstramos neste estudo que os danos oxidativos são eventos encontrados precocemente na sepse. Durante as primeiras horas há a produção de citocinas e quimiocinas, que parecem participar tanto na disfunção cerebral quanto de alterações de permeabilidade da BHE, o que reforça o papel da resposta inflamatória na disfunção aguda do SNC associada à sepse (COMIM et al., 2011). Recente estudo mostra o envolvimento das metaloproteinases (MMP) na quebra da BHE, pois ativadas por citocinas inflamatórias estas enzimas agem na clivagem da matriz extracelular (DAL-PIZZOL et al., 2013). E o estresse oxidativo está envolvido em toda essa gênese, devido a exacerbação da migração de leucócitos para o SNC em decorrência da resposta inflamatória e quebra da BHE e nesse sentido são responsáveis pelo aumento da produção de EROs levando ao dano celular no SNC (COMIM et al., 2011).

O dano oxidativo em lipídios e proteínas foi observado nas estruturas cerebrais estudadas. De fato, o que se observou neste estudo foram efeitos benéficos dos compostos de selênio nos danos oxidativos causados pela sepse, sendo que o DD se mostrou mais eficaz na redução de tais danos comparado ao EB. Efeito benéfico do DD sobre os níveis de dano oxidativo em lipídios havia sido demonstrado em estudo sobre danos no fígado de ratos com sepse (PRAUCHNER; PRESTES; ROCHA, 2011). DD também mostrou uma maior capacidade em diminuir a peroxidação lipídica no cérebro de ratos em comparação com os outros três compostos de selênio em modelo *in vitro* (SANTOS, 2009). Além disso, recentemente verificou-se que o DD mostrou maior aumento da atividade da GPx em relação ao ebselen em resposta a danos endoteliais mediada por peroxinitrito (BEM et al., 2013). A propriedade anti-inflamatória do DD também foi demonstrada em modelo de pleurisia induzida por carragenina em ratos, através da inibição do influxo de leucócitos e de citocinas pró-inflamatórias (LUCHESE et al., 2012). O DD

reduz marcadamente citocinas pró-inflamatórias em plasma e restaurou marcadores de danos cerebrais em ratos com isquemia cerebral (BRÜNING et al., 2012).

Acredita-se na eficácia dos compostos de selênio pela ação mimética a enzima GPx. Sob determinadas condições inflamatórias, a glutatona regula as interações leucócitos-células endoteliais na microvasculatura cerebral (WONG et al., 2011). A função antioxidante da glutatona desempenha um papel crítico na proteção da microvasculatura cerebral contra a isquemia, preservando a perfusão microvascular e a inibindo a expressão de MMP (WONG et al., 2008). Neste sentido, a glutatona mitocondrial é vital na proteção das células contra o estresse oxidativo, pois a maioria das EROS celulares são geradas na mitocôndria, por isso a depleção de glutatona mitocondrial pode levar a disfunção mitocondrial e apoptose (DUKHANDE et al., 2013).

Estudos indicam que o metabolismo energético é fundamentalmente alterado em nível celular durante sepse (COMIM et al., 2011; PERUCHI et al., 2011). Messaris, Memos e Chatzigianni, (2004) demonstraram apoptose neuronal aguda (6-12 horas) mediada pela mitocôndria em cérebros de ratos submetidos a sepse. Estudos anteriores demonstraram que o funcionamento adequado da fosforilação oxidativa mitocondrial é comprometida durante a sepse devido a danos na membrana mitocondrial. Os elétrons que normalmente tem um fluxo através da cadeia transportadora são desviados, gerando ânion superóxido. (CROUSER, 2004). Este processo pode ser bem tolerado pela célula com a atividade de enzimas antioxidantes, porém foi demonstrado que tal atividade é comprometida durante o processo de sepse (ANDRADES et al., 2005). Tal fato pode explicar a diminuição da atividade dos diferentes complexos que encontramos em nosso estudo, visto que com a ação principalmente de DD agindo como um mimético da GPx poderia reverter o dano a membrana mitocondrial e conseqüentemente aos complexos estudados.

Quando a atividade de algum complexo mitocondrial é diminuída a produção de ATP proveniente da fosforilação oxidativa mitocondrial é comprometida. Neste contexto, a creatina quinase desempenha um papel importante no metabolismo energético produzindo ATP para complementar a baixa produção e garantir aos tecidos energia suficiente para que não ocorra dano celular ou protegendo o cérebro contra oscilações energéticas (LIPSKAYA, 2001). Em estudos anteriores a atividade cerebral da creatina quinase mostrou-se alta nas primeiras

horas (6 horas) após a sepse, sendo que há uma diminuição com o passar do tempo (12 horas). Neste contexto, a reação da creatina quinase pode compensar parcialmente a perda energética mitocondrial, ou seja, se não for rapidamente corrigido pelo fosforilação oxidativa, a consequência é a irreversível morte celular (SINGER, 2007). Encontramos em nosso estudo uma diminuição da atividade da CK em diferentes estruturas estudadas e sabe-se que a CK apresenta muitos resíduos de cisteína em sua estrutura (ANDRES et al., 2008). Nesse sentido, grupos sulfidrilas da enzima CK podem ser um importante alvo para oxidação através do NO e outras EROs, principalmente na inibição da CK (WOLOSKER; PANIZZUTTI; 1996). Nesse contexto, podemos perceber que o estresse oxidativo pode estar envolvido no mecanismo de inibição da CK (BARICHELLO et al., 2008). Verificamos, portanto, uma reversão apenas no hipocampo para a atividade da CK em 24h com a administração de DD. Sabe-se que o dano oxidativo parece ser dependente ainda da região do SNC estudada, sendo demonstrado mais consistentemente no hipocampo (BARICHELLO et al., 2006).

Quando falamos de compostos orgânicos de selênio nos remete a ideia da possível toxicidade gerada por tais compostos como no estudo onde foi avaliada a toxicidade e relacionados com a atividade pró-oxidante exibida por estes compostos, quando utilizado em concentrações relativamente elevadas (SANTOS et al., 2009). Os efeitos genotóxicos do DD foram avaliados e foi observado que DD pode induzir genotoxicidade sistêmica em mamíferos, uma vez que provoca danos no DNA em órgãos vitais tais como cérebro, rim e fígado (ROSA et al., 2007). Sendo que nas doses e via de administração aqui utilizada o DD tem se mostrado um composto seguro (PRIGOL et al., 2009).

Finalmente, diante dos nossos resultados e evidências da literatura, podemos dizer que o uso de DD de acordo com a dose utilizada no presente estudo resultou na atenuação do dano cerebral resultante do dano oxidativo e da alteração dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial nos animais submetidos à sepse, resultados esses que foram superiores a utilização de EB.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados no presente estudo podemos constatar que:

- O DD exerce um efeito protetor contra o dano oxidativo em lipídios e proteínas em 12 e 24h após os animais serem submetidos à sepse em diferentes estruturas cerebrais sendo de um modo em geral mais efetivo que o tratamento com EB.

- Nos complexos da cadeia respiratória mitocondrial estudados verificamos uma diminuição de suas atividades nos animais submetidos à sepse nos diferentes tempos estudados e novamente o DD pareceu exercer efeito de reversão desses níveis em várias estruturas cerebrais estudadas, no entanto, o mesmo pareceu não ocorrer com EB.

- A atividade da enzima CK foi diminuída nos animais submetidos à sepse em 12 e 24 horas para diferentes estruturas cerebrais estudadas, e apenas foi revertido tais níveis no hipocampo e somente com a administração de DD.

REFERÊNCIAS

- Acker CI, Luchese C, Prigol M, Nogueira CW. Antidepressant-like effect of diphenyl diselenide on rats exposed to malathion: Involvement of Na⁺K⁺ ATPase activity. *Neurosci Lett.* 2009; 455(3):168–72.
- Aldred S, Griffiths HR. Oxidation of protein in human low-density lipoprotein exposed to peroxy radicals facilitates uptake by monocytes; protection by antioxidants in vitro. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2004; 15(1-2): 111-7.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci.* 1993; 90: 7915-22.
- Andrades M, Ritter C, Moreira JC, Dal-pizzol F. Oxidative parameters differences during non-lethal and lethal sepsis development. *The Journal of Surgical Research.* 2005; 125: 68-72.
- Andres RH, Ducray AD, Schlattner U, Wallimann T, Widmer HR. Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res. Bull.* 2008; 76(4): 329–43.
- Antony S, Bayse CA. Modeling the mechanism of the glutathione peroxidase mimic ebselen. *Inorg Chem.* 2011; 50:12075-84.
- Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry.* 2005; 89: 27-36.
- Babior BM. Superoxide: a two-edged sword. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 1997; 30: 141-55.
- Bandy B, Davison, AJ. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implication for carcinogenesis and aging? *Free Radic Biol Med.* 1990; 8: 523-39.
- Barbosa NBV, Rocha JBT, Wondracek DC, Perottoni J, Zeni G, Nogueira CW. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: Possible relationship with oxidative stress. *Chem Biol Interact.* 2006; 163: 230-38.
- Barceloux DG. Selenium. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1999; 37:145-72.
- Barichello T, Petronilho FC, Silva GZ, Souza B, Savi GD, Feier G, et al. Oxidative damage in the rat hippocampus and cortex after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Proc.* 2008; 2(suppl 1): P6.
- Barichello T, Fortunato JJ, Vitali AM, Feier G, Reinke A, Moreira JC, et al. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med.* 2006; 34(3): 886-9.
- Barrichelo T, Martins MR, Reinke A. Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care Med.* 2005; 33: 221-3.

Beishuizen A, Vermes I, Haanen, C. Endogenous mediators in sepsis and septic shock. *Adv Clin Chem.* 1999; 33: 55-131.

Bem AF, Fiuza B, Calcerrada P, Brito PM, Peluffo G, Dinis TC, et al. Protective effect of diphenyl diselenide against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: A comparison with ebselen. *Nitric Oxide.* 2013; 18: 20-30.

Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M. Chemistry physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 1999; 65: 1865-1874.

Boekema EJ, Braun HP. Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem.* 2007; 282: 1-4.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in Sepsis. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest.* 1992; 101(6): 1481-3.

Borges LP, Nogueira CW, Panatieri RB, Rocha JB, Zeni G. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. *Chem Biol Interact.* 2006; 160:99-107.

Bowler RP, Crapo JD. Oxidative Stress in Airways: is there a Role for Extracellular Superoxide Dismutase? *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166: 38-43.

Brenneisen P, Steinbrenner H, Sies H. Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Mol Aspects Med.* 2005; 26: 256-67.

Brozmanova J, Dudás A, Henriques JAP. Repair of oxidative DNA damage-an important factor reducing cancer risk. *Neoplasma.* 2001; 48: 85-93.

Brüning CA, Prigol M, Luchese C, Jesse CR, Duarte MM, Roman SS, et al. Protective effect of diphenyl diselenide on ischemia and reperfusion-induced cerebral injury: involvement of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines. *Neurochem Res.* 2012; 37(10):2249-58.

Calabrese V, Scapagnini G, Giuffrida-Stella AM, Bates TE, Clark JB, Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem Res.* 2001; 26: 739-64.

Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys.* 1996; 328:309-16.

Cassol-Jr O, Comim CM, Silva BR, Hermani FV, Constantino LS, Felisberto F, et al. Treatment with cannabidiol reverses oxidative stress parameters, cognitive impairment and mortality in rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture. *Brain Res.* 2010; 1348: 128-38.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002; 420:885-91.

Comim CM, Vilela MC, Constantino LS, Petronilho F, Vuolo F, Lacerda-Queiroz N, et al. Traffic of leukocytes and cytokine up-regulation in the central nervous system in sepsis. *Intensive Care Med.* 2011; 37: 711-8.

Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LS, Felisberto F, Petronilho F, Rezin GT, et al. Alterations in inflammatory mediators, oxidative stress parameters and energetic metabolism in the brain of sepsis survivor rats. *Neurochem Res.* 2011; 36: 304-11.

Crouser ED. Mitochondrial Dysfunction in Sepsis Shock and Multiple Organ Dysfunction Syndrome. *Mitochondrion.* 2004; 4: 729-41.

D'Ávila JC, Santiago AP, Amancio RT, Galina A, Oliveira MF, Bozza FA. Sepsis induces brain mitochondrial dysfunction. *Crit Care Med.* 2008; 36(6): 1925-32.

Dal-Pizzol F, Ritter C, Cassol-Jr OJ, Rezin GT, Petronilho F, Zugno AI, et al. Oxidative mechanisms of brain dysfunction during sepsis. *Neurochem Res.* 2010; 35: 1-12.

Dal-Pizzol F, Rojas HA, Dos Santos EM, Vuolo F, Constantino L, Feier G, et al. Matrix Metalloproteinase-2 e metalloproteinase-9 actives are associated with blood-brain dysfunction in an animal model of severe sepsis. *Mol Neurobiol.* 2013; 12.

Deitch EA. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock.* 2005; 24: 19-23.

Dobrachinski F, Bastos LL, Bridi JC, Corte CL, Ávila DS, Rocha JB, et al. Cooperation of Non-Effective Concentration of Glutamatergic System Modulators and Antioxidant Against Oxidative Stress Induced by Quinolinic Acid. *Neurochem Res.* 2012; 37(9):1993-2003.

Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med.* 2007; 35: 1244-50.

Dukhande VV, Kawikova I, Bothwell AL, Lai JC. Neuroprotection against neuroblastoma cell death induced by depletion of mitochondrial glutathione. *Apoptosis.* 2013; 18(6):702-12.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 407-21.

Ferreira A, Matsubaba LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Ass med Brasil.* 1997; 43: 61-8.

Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res.* 1990; 49: 186-96.

Fischer JC, Jansen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta.* 1985; 153:23-6.

Forder JP, Tymianski M. Postsynaptic mechanisms of excitotoxicity: involvement of postsynaptic density proteins, radicals and oxidant molecules. *Neurosci*. 2009; 158: 293-300.

Forman HJ, Torres M. Reactive Oxygen Species and Cell Signaling: Respiratory Burst in Macrophage Signaling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166: 4-8.

Fridovich, I. Superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem*. 1997; 272(30): 18515-7.

Fridovich I. Oxygen Toxicity: a Radical Explanation. *J Exp Biol*. 1998;201:1203-9.

Gaetke LM, Chow CK. Copper Toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*. 2003; 189: 147-63.

Garrabou G, Morén C, López S, Tobías E, Cardellach F, Miró O, et al. The effects of sepsis on mitochondria. *J Infect Dis*. 2012; 205:392-400.

Gil N, Gomez JC, Gomez A. Radicais libres y lesión cerebral. *Univ Méd Bogotá*. 2008; 49: 231-42.

Gilgun-sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D. Antioxidant Therapy in Acute Central Nervous system Injury: Current State. *Pharmacol Rev*. 2002; 54(2): 271-84.

Gofton TE, Young GB. Sepsis-associated encephalopathy. *Nat Rev Neurol*. 2012; 8: 557-66.

Günçin I, Beydemir S, Alici HÁ, Emastas M, Büyükkuroglu ME. In Vitro Antioxidant Properties of Morphine. *Pharmacol Res*. 2004; 49: 59-66.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3 ed. Oxford: London; 1999.

Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*. 2001; 9: 685-716.

Harrois A, Huet O, Duranteau J. Alterations of mitochondrial function in sepsis and critical illness. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2009; 22: 143-49.

He M, Xing S, Yang B, Zha OL, Hua H, Liang Z, et al. Ebselen attenuates oxidative DNA damage and enhances its repair activity in the thalamus after focal cortical infarction in hypertensive rats. *Brain research*. 2007; 181: 83-92.

Horn D, Barrientos A. Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase. *IUBMB Life*. 2008; 60: 421-9.

Horton JW. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology*. 2003; 189: 73-88.

Hughes BP. A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathologic sera. *Clin Chim Acta*. 1962; 7: 597-604.

Instituto Latino Americano de Sepse. Campanha sobrevivendo a sepse. [home page na internet]. [acesso em 19 de maio 2012]. Disponível em: <http://www.sepsinet.org/PDF/Relatorio%20Nacional%20SSC.pdf>.

Jackson AC, Gilbert JJ, Young GB, Bolton CF. The encephalopathy of sepsis. *Can J Neurol Sci*. 1985; 12(4):303–7.

Janeway, CA. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect*. 2001; 11: 67-71.

Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Miranda M, Asensio S, Barcia JM, Romá J, et al. Ebselen prevents chronic alcohol-induced rat hippocampal stress and functional impairment. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007; 31: 486-92.

Kanno S, Shouji A, Asou K, Ishikawa M. Effects of Naringin on Hydrogen Peroxide-Induced Cytotoxicity and Apoptosis in P388 Cells. *J Pharmacol Sci*. 2003; 92(2): 166-70.

Kono H, Arteel GE, Rusyn I, Sies H, Thurman RG. Ebselen prevents early alcohol-induced liver injury in rats. *Free Radic Biol Med*. 2001; 15: 403-11.

Kumar SS, Shanmugasundaram KR. Amrita-Bindu - an antioxidant inducer therapy in asthma children. *J Ethnopharmacol*. 2004; 90: 105- 14.

Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, Linde-Zwirble WT, Harvey M, Regan S, et. al. The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Crit Care Med*. 2010; 38: 367-74.

Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(6):446-58.

Lipskaya TY. Mitochondrial Creatine Kinase: Properties and Function. *Biochem*. 2001; 66: 1361-76.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.

Luchese C, Prigol M, Duarte, MMF, Nogueira CW. Diphenyl diselenide reduces inflammation in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan: reduction of pro-inflammatory markers and reactive species levels. *Inflamm. Res Inflamm Res*. 2012; 61: 1117-24.

Mahan LK, Escott-Stump S. Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. Rocca. 2005; 11: 305.

Maier C, Chan PH. Role Superoxide Dismutases in Oxidative Damage and Neurodegenerative Disorders. *Neuroscientist*. 2002; 8(4): 323-34.

Marks DB, Marks AD, Smith CM. *Basic Medical Biochemistry. A Clinical Approach*. Maryland: Williams & Wilkins; 1996.

Maxwell SRJ. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*. 1995; 49: 345-61.

Mazzanti CM, Spanevello RM, Morsch A, Zanin R, Battisti V, Ahmed M et al. Previous treatment with ebselen and vitamin E alters adenine nucleotide hydrolysis in platelets from adult rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. *Life Sci*. 2007; 27: 241-8.

Meotti, FC, Stangherlin EC, Zeni G, Nogueira CW, Rocha JBT. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environ Res*. 2004; 94: 276-82.

Messaris E, Memos N, Chatzigianni E. Time-dependent mitochondrial-mediated programmed neuronal cell death prolongs survival in sepsis. *Crit Care Med*. 2004; 32: 1764–70.

Molina MF, Sanchez-Reus I, Iglesias I, Benedi J. Quercetin a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. *Biol Pharm Bull*. 2003; 26: 1398-402.

Motoyama T, Okamoto K, Kukita I, Hamaguchi H, Kinoshita Y, Ogawa H. Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*. 2003; 31: 143-9.

Navarro A, Boveris A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol*. 2007; 292: 670-86.

Nogueira CW, Rocha JB. Toxicologia e Farmacologia de selênio: ênfase em compostos sintéticos organosselênio. *Arch Toxicol*. 2011; 85: 1313-59.

Papadopoulos MC, Davies DC, Moss RF, Tighe D, Bennett E.D. Pathophysiology of sepsis encephalopathy: a review. *Crit Care Med*. 2000; 28: 3019-24.

Pawlas N, Malecki A. Effects of ebselen on glutathione level in neurons exposed to arachidonic acid and 4- hydroxynonenal during simulated ischemia *in vitro*. *Pharmacol Rep*. 2007; 59(6): 708-14.

Peruchi BB, Petronilho F, Rojas HA, Constantino L, Mina F, Vuolo F, et al. Skeletal muscle electron transport chain dysfunction after sepsis in rats. *J Surg Res*. 2011; 15: 167.

Petronilho F, Périco SR, Vuolo F, Mina F, Constantino L, Comim CM, et al. Protective effects of guanosine against sepsis-induced damage in rat brain and cognitive impairment. *Brain Behav Immun*. 2012; 26:904-10.

Pierre JL, Fontecave M. Iron and Activated Oxygen Species in Biology: The Basic Chemistry. *Biometals*. 1999; 12: 195-99.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR-4 gene. *Science*. 1998; 282:2085-8.

Prauchner CA, Prestes AS, Rocha JBT. Effectes of diphenyl diselenide on oxidative stress induced by sepsis in rats. *Pathology- research and practice*. 2011; 207: 554-8.

Prigol M, Schumacher RF, Nogueira C, Zeni G. Convulsant effect of diphenyl diselenide in rats and mice and its relationship to plasma levels. *Toxicol Lett*. 2009; 189: 35-9.

Reinhart K, Karzai W. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. *Crit Care Med*. 2001; 29: 121-5.

Rezin, GT. Efeito da cetamina sobre alterações metabólicas em cérebro de ratos submetidos a um modelo animal de depressão [dissertação de mestrado]. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2008.

Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*. 1994; 233: 357-63.

Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol*. 2007; 81: 137-43.

Roos DH, Puntel RL, Santos MM, Souza DOG, Farina M, Nogueira CW, et al. Guanosine and synthetic organoselenium compounds modulate methylmercury-induced oxidative stress in rat brain cortical slices: Involvement of oxidative stress and glutamatergic system. *Toxicol in Vitro*. 2009; 23(2): 302-7.

Rosa RM, Hoch NC, Furtado GV, Saffi J, Henriques JA. DNA damage in tissues and organs of mice treated with diphenyl diselenide. *Mutat Res*. 2007; 633: 35-45.

Rustin P, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*. 1994; 228: 35-51.

Santos DB, Schiar VP, Ribeiro MC, Schwab RS, Meinerz DF, Allebrandt J, et al. Genotoxicity of organoselenium compounds in human leukocytes in vitro. *Mutat Res*. 2009; 676(1-2): 21-6.

Santos FW, Oro T, Zeni G, Rocha JBT, Nascimento PT, Nogueira CW. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. *Toxicol Lett*. 2004; 152: 255-63.

Semmler A, Frisch C, Debeir T, Ramanathan M, Okulla T, Klockgether T, et al. Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Exp Neurol*. 2007; 204(2): 733-40.

Shan X, Aw TY, Jones DP. Ghuttathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol Ther.* 1990; 47: 61-71.

Siame S, Annane D, Sharshar T. The encephalopathy in sepsis. *Crit Care Clin.* 2008; 24: 67-82.

Silva MH, da Rosa EJ, de Carvalho NR, Dobrachinski F, da Rocha JB, Mauriz JL, González-Gallego J, Soares FA. Acute brain damage induced by acetaminophen in mice: effect of diphenyl diselenide on oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Neurotox Res.* 2012; 21: 334-44.

Singer M. Mitochondrial function in sepsis: acute phase versus multiple organ failure. *Crit Care Med.* 2007; 35:S441-8.

Spector A, Wilson SR, Zucker PA, Huang RR, Raghavan PR. The synthesis of glutathione peroxidase analogs. *Lens Eye Toxic Res.* 1989; 6:773-80.

Takasago T, Peters EE, Graham DI, Masayasu H, Macrae IM. Source Neuroprotective efficacy of ebselen, an anti-oxidant with anti-inflammatory actions, in a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion. *Br J Pharmacol.* 1997; 122: 1251-6.

Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* 2002; 23: 301-4.

Turi JL, Yang F, Garrick MD, Piantadosi CA, Ghio AJ. The iron cycle and oxidative stress in the lung. *Free Radic Biol Med.* 2004; 36(7): 850- 7.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003; 15: 335–44.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova.* 2007; 30: 1323-38.

Vincent JL, Korkut HA. Defining sepsis. *Clin Chest Med.* 2008; 29: 585-90.

Yu BP. Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. *Physiol Rev.* 1994; 74: 139-62.

Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J.* 1992; 281: 21– 40.

Ward RJ, Peters TJ. Free Radicals. In: Marshall WJ, Bangert SK. *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects.* New York: hurchill Livingstone; 1995. p. 765-77.

Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock-a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 1980; 29: 189-201.

Wolosker H, Panizzutti R, Engelender S. Inhibition of creatine kinase by S-nitrosoglutathione. *FEBS Lett.* 1996; 392(3): 274–6.

Wong CH, Abeynaike LD, Crack PJ, Hickey MJ. Divergent roles of glutathione peroxidase-1 (Gpx1) in regulation of leukocyte-endothelial cell interactions in the inflamed cerebral microvasculature. *Microcirculation.* 2011; 18: 12-23.

Wong CH, Bozinovski S, Hertzog PJ, Hickey MJ, Crack PJ. Absence of glutathione peroxidase-1 exacerbates cerebral ischemia-reperfusion injury by reducing post-ischemic microvascular perfusion. *J Neurochem.* 2008; 107: 241-52.