



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
CHARLES MARTINS DE CASTRO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO DISSELENETO DE DIFENILA SOBRE O DANO À
PROTEÍNA EM ÓRGÃOS DE RATOS SUBMETIDOS À SEPSE**

Tubarão
2013

CHARLES MARTINS DE CASTRO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO DISSELENETO DE DIFENILA SOBRE O DANO À
PROTEÍNA EM ÓRGÃOS DE RATOS SUBMETIDOS À SEPSE**

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

Orientadora: Prof^a Gislaine Tezza Rezin, Dra.

Tubarão

2013

PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Título da Dissertação

“Avaliação do efeito do disseleneto de difenila sobre dano à proteína em órgãos de ratos submetidos à Sepsé.”

CHARLES MARTINS DE CASTRO

AUTOR

Aprovado pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 18 de março de 2013.

Doutora Gislaine Tezza Rezin (orientador)

Doutora Larissa de Souza Constantino (avaliador externo)

Doutor a Anna Paula Piovezan (avaliador interno)

Prof.^a. Doutora Rosemeri Maurici da Silva

COORDENADORA DO PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

RESUMO

A importância das espécies reativas de oxigênio (ERO) na fisiopatologia da sepse encontra-se bem estabelecida. Porém ainda não se dispõe de uma terapia antioxidante eficaz para a utilização nestes pacientes. Sabe-se que as mitocôndrias, dos diversos órgãos, apresentam resistências diferentes ao dano oxidativo. Em uma primeira fase, avaliamos o efeito sobre a mortalidade em 10 dias de diversas doses do disseleneto de difenila (PhSe)₂ (10 mg/Kg, 50 mg/Kg, 100 mg/Kg) após indução de sepse em um modelo animal por ligação e perfuração cecal (CLP – do inglês *Cecal Ligation and Puncture*) em relação ao modelo CLP + veículo e sham. A dose de 50 mg/Kg de (PhSe)₂ foi a única que acarretou uma redução significativa da mortalidade em relação ao sham (30% versus 70% respectivamente). Em uma segunda fase, avaliamos a ação do (PhSe)₂ 50 mg/Kg sobre a carbonilação de proteínas, 12 e 24 horas após a indução de sepse no mesmo modelo animal de CLP. Ratos Wistar adultos (250-300g) foram divididos em 3 grupos (sham, CLP + veículo e CLP + 50 mg/Kg de (PhSe)₂). O antioxidante foi administrado 1 e 12 horas após o procedimento cirúrgico. Sendo que os animais foram eutanasiados 12 e 24 horas após a cirurgia, com posterior remoção do fígado, baço, pulmão, coração, rim e quadríceps para análise da carbonilação de proteínas. Com 12 horas de evolução, a presença de proteínas carboniladas no fígado, baço e rins dos ratos submetidos à CLP demonstrou-se significativamente maior quando comparado ao grupo sham. A adição do (PhSe)₂ acarretou uma redução significativa da carbonilação protéica no fígado, coração e rim. Com 24 horas de evolução, a presença das proteínas carboniladas manteve-se significativamente mais elevada no fígado, baço e rim, além de se mostrar elevada no coração e quadríceps dos ratos submetidos à CLP. Na avaliação tardia, a adição do (PhSe)₂ acarretou redução das proteínas carboniladas apenas no coração e quadríceps. Apesar da redução da mortalidade demonstrada na primeira fase do estudo, a análise individual dos órgãos na fase seguinte mostrou-se discrepante, com atividade antioxidante do (PhSe)₂ apenas em alguns órgãos.

Palavras-chave: Sepse. Órgãos. Ratos. Estresse oxidativo. Disseleneto de difenila.

ABSTRACT

The importance of reactive oxygen species in the pathophysiology of sepsis is well established. But not yet has an effective antioxidant therapy for use in these patients. It is known that mitochondria from different organs have different resistances to oxidative damage. In a first step, we evaluated the effect on mortality at 10 days of various doses of diphenyl diselenide (PhSe)₂ (10 mg / kg, 50 mg / kg, 100 mg / kg) following induction of sepsis in an animal model for Cecal Ligation and puncture (CLP) in relation to the model CLP + vehicle and sham. The dose of 50 mg / kg (PhSe)₂ was the one that caused a significant reduction of mortality compared to the sham group (30% vs 70% respectively). In a second phase, we evaluate the action of (PhSe)₂ 50 mg / kg on protein carbonylation, 12 and 24 hours after induction of sepsis in the same animal model CLP. Male Wistar rats (250-300g) were divided into 3 groups (sham, vehicle + CLP and CLP + 50 mg / kg (PhSe)₂). The antioxidant was administered 1 and 12 hours after the surgical procedure. Since the animals were sacrificed 12 and 24 hours after surgery, with subsequent removal of the liver, spleen, lung, heart, kidney and quadriceps for analysis of protein carbonylation. At 12 hours later, the presence of protein carbonyls in the liver, spleen and kidneys of rats subjected to CLP showed significantly higher compared to the sham group. The addition of (PhSe)₂ caused a significant reduction in protein carbonylation in the liver, heart and kidney. After 24 hours of evolution, the presence of carbonyl protein remained significantly higher in the liver, spleen and kidneys, in addition to show elevated in heart and quadriceps of rats subjected to CLP. In late evaluation, the addition of (PhSe)₂ caused a reduction of carbonyl protein only in the heart and quadriceps. Despite the reduction in mortality, the analysis of individual organs showed discrepant with antioxidant activity of (PhSe)₂ only in some organs.

Key-words: Sepsis. Organs. Rats. Oxidative stress. Diphenyl diselenide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Curva de sobrevivência de acordo com a dose de (PhSe) ₂	25
Figura 2 – Concentração de proteínas carboniladas em órgãos de ratos 12 horas após a indução de sepse e tratados com (PhSe) ₂	26
Figura 3 – Concentração de proteínas carboniladas em órgãos de ratos 24 horas após a indução de sepse e tratados com (PhSe) ₂	27

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA-D - ácido Δ -aminolevulínico desidratase
ATP – Adenosina Tri-Fosfato
CLP - ligação e perfuração cecal
COX - citocromo c oxidase
DNA - ácido desoxirribonucleico
ERN - espécies reativas do nitrogênio
ERO - espécies reativas de oxigênio
GPx – glutathione peroxidase
GSH – glutathione reduzida
 H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio
iNOS - óxido nítrico sintase inducível tipo II
LDL - lipoproteína de baixa densidade
MnSOD - superóxido-dismutase manganês
mtDNA - DNA mitocondrial
NO - Óxido nítrico
 O_2 - Oxigênio molecular
 O_2^- - Ânion Superóxido
 OH^- - Radical hidroxila
 ONO_2^- - Peroxinitrito
pH – potencial hidrogeniônico
(PhSe) $_2$ – disseleneto de difenila
Redox – oxidação-redução
RNA – Ácido ribonucleico
Se - Selênio
SIRS - síndrome de resposta inflamatória sistêmica
SOD - superóxido dismutase
TBARS - espécies reativas do ácido tiobarbitúrico
TSH – tioredoxina
UTI - Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE SIGLAS

ACCP - American College of Chest Physicians

ATS - American Thoracic Society

BASES - Brazilian Sepsis Epidemiological Study

ESICM - European Society of Intensive Care Medicine

REDOX - Trial of Glutamine and Antioxidant Supplementation in Critically Ill Patients

SCCM - Society of Critical Care Medicine

SIGNET – Scottish Intensive care Glutamine or seleNium Evaluative Trial

SIS - Surgical Infection Society

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 SEPSE	8
1.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA	10
1.3 DANO OXIDATIVO	11
1.4 SELÊNIO	14
1.5 DISSELENETO DE DIFENILA	16
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	21
4 METODOLOGIA	22
4.1 ANIMAIS	22
4.2 MODELO ANIMAL DE SEPSE E TRATAMENTO	22
4.3 DETERMINAÇÃO DA CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS	23
4.4 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	23
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
5 RESULTADOS	25
6 DISCUSSÃO	28
7 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 SEPSE

A sepse, descrita em artigos científicos desde 1873 (FERRIER, 1873), continua após quinze décadas, como uma das mais importantes causas de mortalidade no mundo moderno (GAO et al., 2005; INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE, 2012; KORTGEN et al., 2006; SEBAT et al., 2005; SHAPIRO et al., 2006; TRZECIAK et al., 2006). Até o início da década de 1990, a grande variedade de definições e termos utilizados levava a uma estratificação imprecisa, não permitindo a comparação e avaliação dos vários estudos que eram desenvolvidos sobre o assunto. Apartir de 1991, durante a conferência da *American College of Chest Physicians* (ACCP) e da *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) os conceitos foram homogeneizados. Definiu-se, então, sepse como a síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) desencadeada em resposta a uma infecção, mesmo que esta estivesse restrita ou localizada em um determinado órgão ou sistema (BONE et al., 1992; MARIK; VARON, 2008).

A SIRS é caracterizada pela presença de dois dos quatro seguintes critérios: (a) temperatura corporal superior a 38°C ou inferior a 36°C; (b) frequência cardíaca acima de 90 batimentos por minuto; (c) taquipnéia manifestada por uma frequência respiratória maior que 20 respirações por minuto ou uma pressão arterial de CO₂ (PaCO₂) < 32 mmHg; (d) contagem de leucócitos superior a 12.000 células/mm³ ou, menos de 4.000 células/mm³, ou a presença de mais de 10% de neutrófilos imaturos. Muitos pacientes apresentam quadros de SIRS não desencadeados por uma infecção, porém apresentam um mecanismo fisiopatológico semelhante, motivo pelo qual muitos estudos de pacientes com SIRS sem sepse são utilizados no entendimento da sepse (INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE, 2012).

A sepse, devido a sua elevada complexidade fisiopatológica, apresenta uma grande variabilidade quanto à gravidade das manifestações clínicas, indo desde casos leves até casos que evoluem para óbitos em pequeno lapso de tempo. Para tanto, no intuito de estratificar melhor os pacientes acometidos, conceitos acessórios foram acrescentados e, desta forma permitir uma melhor comparabilidade dos resultados tanto diagnósticos, quanto terapêuticos. O termo de sepse grave foi

definido como uma sepse com sinais de disfunção de dois ou mais órgãos ou sistemas, ou evidência de hipoperfusão ou hipotensão arterial. Choque séptico foi definido como a hipotensão arterial induzida pela sepse, que persiste apesar da reposição adequada de líquidos, juntamente com a presença de anomalias da perfusão ou disfunção orgânica. O termo falência de múltiplos órgãos e sistemas passou a ser utilizado quando o paciente apresenta a disfunção de dois ou mais órgãos ou sistemas que necessitem de terapia de suporte/substituição. Bacteremia foi definida como a presença de bactérias viáveis na corrente sanguínea, e o termo septicemia foi abandonado (ANGUS et al., 2001; DELLINGER et al., 2008; MARTIN, 2006). Com a homogeneização dos conceitos, foi possível uma melhor avaliação da real incidência da sepse em seus diversos graus de gravidade, bem como as suas taxas de morbi-mortalidade e custos (INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE, 2012; SILVA et al., 2004; TALMOR et al., 2008; WARREN, 1997).

Aproximadamente 70% dos pacientes admitidos em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) desenvolvem SIRS tanto de origem infecciosa (sepse) como não infecciosa (politraumatismo, cirurgias, pancreatite e queimaduras) (ABRAHAM et al., 2000; MILLS; CALDWELL; JANN, 1989; MOORE; MOORE; READ, 1993; SILVA et al., 2004). Quando associada à hipotensão arterial sistêmica de difícil controle, este estado tende a progredir rapidamente para falência de múltiplos órgãos e sistemas (ANGUS et al., 2001; BONE et al., 1992; CIPOLLE; PASQUALE; CERRA, 1993; SALVO et al., 1995), com nítido aumento na taxa de mortalidade tanto precoce quanto tardia (BRUN-BUISSON et al., 1995; SALVO et al., 1995).

Dados demonstram que nos Estados Unidos ocorrem aproximadamente 750.000 casos de sepse por ano, sendo que a sepse, SIRS e choque séptico juntos representam a causa mais importante de morte em UTIs, superando as doenças cardiovasculares (ANGUS et al., 2001). Um estudo realizado na França, com 3.738 pacientes críticos, demonstrou uma incidência de 14,6% de sepse severa e choque séptico e, apresentou uma taxa de mortalidade de 35% em até 30 dias (BRUN-BUISSON et al., 2004). Na Europa um estudo envolvendo 24 países indicou, entre pacientes críticos, a incidência de 37% de sepse. Entre os pacientes com sepse severa a mortalidade foi de 32,2% e entre os pacientes com choque séptico de 54,1% (VINCENT et al., 2006). No Brasil, um estudo BASES (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*) realizado em 2004, envolveu cinco UTIs dos estados de São

Paulo e Santa Catarina, e mostrou uma incidência de 46,9% para sepse, 27,3% para sepse severa e 23% para choque séptico. As taxas de mortalidade foram de 33,9%, 46,9% e 52,2%, respectivamente (SILVA et al., 2004). Outro estudo realizado no Hospital São Lucas-PUCRS, entre os anos de 2003 e 2004, demonstrou uma incidência de 30% de choque séptico e uma taxa de mortalidade de 66,5% entre esses pacientes (DIAS et al., 2007).

Diante destes fatos, a sepse é a doença que mais gera custos, tanto em setores públicos como em setores privados, e é a principal causa de morte nas UTIs, superando o infarto agudo do miocárdio e o câncer, segundo o Instituto Latino Americano de Sepse (INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE, 2012).

1.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A resposta imuno-inflamatória é composta por citocinas e outros mediadores que são essenciais na defesa do hospedeiro e, de eventos moleculares complexos subjacentes. Há uma desregulação desta resposta na sepse, levando a uma excessiva e inapropriada liberação de mediadores, com consequentes danos celulares em múltiplos órgãos. A ativação dos sistemas imunes e inflamatórios ocorre em resposta a estímulos tanto infecciosos quanto não infecciosos. Na sepse, organismos Gram-negativos e, cada vez mais, Gram-positivos são importantes agentes causais. A infecção resulta inicialmente na estimulação da resposta imune inata (não específica) mediada principalmente através de células inflamatórias como monócitos/macrófagos e neutrófilos. Estas células normalmente existem num “Estado não ativado”, mas são rapidamente ativadas em resposta às bactérias ou aos seus produtos e/ou mediadores inflamatórios, para se tornarem fagócitos altamente ativos. Assim, eles podem contribuir para o desenvolvimento de lesões através de mediadores como citocinas e espécies reativas de oxigênio (ERO) (VICTOR; ROCHA; DE LA FUENTE, 2004).

Como a maioria das infecções ocorre principalmente no tecido e não na corrente sanguínea, o extravasamento de leucócitos é essencial para o contato entre células inflamatórias e os patógenos exógenos. Os leucócitos tem apenas um curto tempo de vida no local da inflamação. Os neutrófilos rapidamente sofrem apoptose e são limpos por macrófagos que migram para o local inflamado durante a fase de resolução. Assim, um evento inflamatório bem-sucedido requer não somente a

ativação apropriada de células e mediadores com subsequente fagocitose e remoção do estímulo agressor, mas também uma consequente e apropriada eliminação das células inflamatórias e detritos para permitir que os tecidos possam retornar a uma arquitetura e função normal (VICTOR; ROCHA; DE LA FUENTE, 2004).

Com o objetivo de aprimorar e agregar o conhecimento produzido em uma década, em 2001, a SCCM conjuntamente com a ACCP, a *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM), a *American Thoracic Society* (ATS) e a *Surgical Infection Society* (SIS) realizaram uma nova conferência. Foi concluído que no futuro, se existirem dados epidemiológicos mais robustos, seria possível usar uma definição puramente bioquímica e/ou imunológica, ao invés de critérios clínicos, para identificar os processos na resposta inflamatória, substituindo desta forma os critérios de SIRS (LEVY et al., 2003).

Apesar de ainda não ser possível um diagnóstico de SIRS e sepse baseado apenas em parâmetros bioquímicos (LEVY et al., 2003), a utilização destes critérios para melhor entendimento fisiopatológico e, principalmente desenvolvimento de terapias mais específicas e eficazes para o tratamento da sepse, tornam-se de suma importância, visto que a terapia baseada apenas em suporte hemodinâmico/metabólico sistêmico apresenta uma grande limitação na redução de morbidade e mortalidade conforme as estatísticas atuais revelam. Portanto, a abordagem com terapias que interferem nos mediadores imuno-inflamatórios e/ou reduzem as lesões causadas por EROs tornam-se uma possibilidade e, os estudos tem sido promissores (LEVY et al, 2003; PRAUCHNER; PRESTES; DA ROCHA, 2011; VICTOR; ROCHA; DE LA FUENTE, 2004).

1.3 DANO OXIDATIVO

O estresse oxidativo é induzido em resposta a sepse e a vários outros estresses fisiológicos, tais como isquemia/reperfusão, regeneração hepática, choque hemorrágico e agentes quimioterápicos (PAHL, 1999). Em células aeróbicas normais, uma pequena quantidade do oxigênio consumido é reduzido para substâncias químicas altamente reativas que, coletivamente são chamadas de ERO. O equilíbrio do estado intracelular de oxidação-redução (redox) é importante fisiologicamente em termos de manutenção da homeostase (ARRIGO, 1999) e, sob

condições fisiológicas, um equilíbrio homeostático existe entre a formação de ERO e a remoção endógena dos compostos oxidantes (GUTTERIDGE; MITCHELL, 1999). O dano oxidativo ocorre quando esse equilíbrio homeostático é rompido pela produção excessiva de ERO, incluindo superóxido (O_2^-) / peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^-), e/ou as defesas antioxidantes são inadequadas (mudanças na superóxido dismutase (SOD), catalase, vitamina C, vitamina E e glutathiona reduzida (GSH)) (GUTTERIDGE, 1995). Portanto, as células estão sob estresse oxidativo quando existe um desequilíbrio entre os pró-oxidantes e antioxidantes e, ambos ocorrem na sepse (BERLETT; STADTMAN, 1997).

A mitocôndria recebe especial atenção quando se trata de estresse oxidativo, por ser o principal sítio do metabolismo aeróbico, onde há fisiologicamente a transferência de elétrons da cadeia respiratória para o oxigênio molecular (O_2) que é então reduzido a ERO (superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil), sendo normalmente controlados pelos mecanismos antioxidantes presentes. A membrana interna da mitocôndria tem uma grande área de superfície que é impermeável e contém as enzimas envolvidas na produção de adenosina trifosfato (ATP). A produção de ATP ocorre através de um fluxo de elétrons ao longo de cinco complexos moleculares da cadeia de transporte de elétrons. A redução eletrônica de O_2 ocorre no sistema de transporte de elétrons mitocondrial de todas as células aeróbicas. A enzima responsável por catalisar esta reação (citocromo c oxidase (COX)) contém os metais ferro e cobre. Estes íons podem ser paramagnéticos e conter elétrons instáveis desemparelhados. Ao utilizar os elétrons desemparelhados nestes metais de transição para controlar as reações do oxigênio molecular, as mitocôndrias impedem a liberação indesejada de ERO (VICTOR; ROCHA; DE LA FUENTE, 2004). A transferência de elétrons acarreta no bombeamento de prótons, criando um potencial de membrana mitocondrial. Como parte deste processo, as ERO são geradas como subprodutos da redução incompleta do oxigênio molecular, o receptor final de elétrons no processo de produção de ATP (GALLEY, 2011).

O dano oxidativo à membrana mitocondrial resulta em despolarização da membrana e o desacoplamento da fosforilação oxidativa, com alteração da respiração celular, levando a danos mitocondriais, com liberação de citocromo c, ativação das caspases e possível apoptose celular (NATHAN; SINGER, 1999). A oxidação do ácido desoxirribonucléico (DNA) e proteínas tem lugar ao longo do dano à membrana por causa da peroxidação lipídica, levando a alterações na

permeabilidade da membrana, modificação da estrutura da proteína e mudanças funcionais (ZIMMERMAN, 1995).

A produção de ERO nas mitocôndrias é importante na função celular normal, pois além da produção de energia, participa de vias de sinalização celular e homeostase do cálcio e ferro (GALLEY, 2011; KAKKAR; SINGH, 2007). As ERO são segundos mensageiros importantes, gerados em resposta a vários tipos de estresses, ativando vias de transdução de sinais que influenciam na atividade celular. Além de produzir ERO, a cadeia respiratória mitocondrial produz também óxido nítrico, que após reagir com o superóxido é transformado em peroxinitrito ($O_2^- + NO \rightarrow ONO_2^-$), que possui um elétron desemparelhado e é, portanto, um radical livre, pertencente a um outro grupo de subprodutos chamados de espécies reativas do nitrogênio (ERN). A produção de óxido nítrico é aumentada durante a sepse por síntese através da forma induzível do óxido nítrico sintase tipo II (iNOS). O óxido nítrico e as ERN têm várias funções fisiológicas vitais, mas ERN tem efeitos deletérios através da oxidação, nitrosilação, ou nitratação de várias moléculas celulares, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, e antioxidantes endógenos, tais como a glutathiona (GALLEY, 2011; KAKKAR; SINGH, 2007).

Quando as defesas antioxidantes são insuficientes, o estresse oxidativo pode causar danos significativos aos lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, tanto dentro da mitocôndria como no citoplasma. A peroxidação da cardiolipina mitocondrial, que está presente na membrana interna e é importante para a produção de ATP, leva a dissociação do citocromo c e reduz a produção de ATP, produzindo mais ERO (DRÖGE, 2002; JAMES; MURPHY, 2002; TURRENS, 2003). Os sistemas antioxidantes endógenos também podem ser afetados pelo estresse oxidativo através da oxidação e peroxidação das enzimas componentes (catalase, GPx, SOD). O DNA mitocondrial (mtDNA) também é alvo dos danos, uma vez que está próxima a região do transporte de elétrons (OZAWA, 1999). O mtDNA codifica vários polipeptídeos, espécies de ácido ribonucléico (RNA) mensageiro e RNA ribossomais que são vitais para o transporte de elétrons e geração de ATP. Como o mtDNA expressa todos os genes codificadores, ao contrário do DNA genômico que não expressa todas as sequências, sofre maior potencial para mutações funcionais (VAN REMMEN; RICHARDSON, 2001). Danos causados pelo estresse oxidativo mediado pelo mtDNA podem levar a maior produção dos ERO e mais dano do mtDNA, ocasionando um ciclo vicioso (GALLEY, 2011).

Existem vários sistemas antioxidantes mitocondriais, constituídos e regulados por uma combinação de vias enzimáticas e não-enzimáticas. Estes incluem os sistemas superóxido-dismutase manganês (MnSOD), a glutathione, tioredoxina (TSH), peroxirredoxinas, sulfilredoxinas, citocromo c, peroxidase e catalase. Quando o estresse oxidativo está em um nível basal (baixo), ambos os sistemas mantêm os níveis de peróxido de hidrogênio (LOWES; GALLEY, 2001).

A disfunção orgânica induzida pela sepse, pelo menos em parte é secundária a disfunção mitocondrial como resultado do estresse oxidativo e, resulta na incapacidade da produção de ATP (BREALEY; SINGER, 2003; CROUSER, 2004). A complexa rede de eventos que agem direta ou indiretamente na função mitocondrial e produção de energia tende a auto perpetuação e amplificação e, a melhora progressiva na respiração mitocondrial está associada com a recuperação da função dos órgãos em pacientes que sobrevivem a sepse (BREALEY et al., 2003) como também em modelos animais de sepse (BREALEY; KARYAMPUDI; JACQUES, 2004; CROUSER et al., 2002; VANHOREBEEK et al., 2005). Além disso, a gravidade da insuficiência orgânica e evolução apresentam relação como o grau de alteração do equilíbrio redox mitocondrial e depleção de antioxidantes associados à disfunção mitocondrial (BREALEY et al., 2002; YASSEN et al., 1999).

Portanto, os danos mitocondriais causados pelo estresse oxidativo parecem ser fundamentais para a fisiopatologia da insuficiência orgânica na sepse, sugerindo um papel terapêutico dos antioxidantes. Apesar disso, a suplementação com antioxidantes não tem demonstrado redução de complicações em estudos com pacientes sépticos (MISHRA, 2007; RINALDI; LANDUCCI; DE GAUDIO, 2009).

1.4 O SELÊNIO

O selênio (Se) é um elemento essencial na dieta e compõe uma série de enzimas, dentre elas a glutathione peroxidase (GPx) (FLOHE; GÜNZLER; SCHOCK, 1973; URSINI et al., 1982), e como selenocisteína (BOCK et al., 1991) faz parte de outras enzimas tal como a 59-deiodinase (BARBOSA et al., 1998; BEHNE; KYRIAKOPOULOS, 1990). Como micronutriente antioxidante, age principalmente através das seleno-proteínas nas membranas. A seleno-proteína P é o principal seleno-componente do plasma em indivíduos saudáveis (52% do total, a glutathione = 39%, albumina = 9% e forma livre < 1%) (HARRISON; LITTLEJOHN; FELL, 1996)

apresentando uma redução drástica em pacientes com choque séptico e parece estar envolvido na proteção do endotélio (FORCEVILLE, 2007).

O efeito quimio-preventivo do Se não pode ser completamente explicado pelo papel como um componente da enzima antioxidante GPx, o que sugere que a quimio-prevenção ocorre por outros mecanismos. O Se apresenta uma ação dupla, a primeira são os seleno-compostos, entre os quais destaca-se o selenito de sódio, que apresenta uma ação pró-oxidante direta e que leva à toxicidade aguda, mas também apresenta uma segunda ação como antioxidante essencial através das seleno-proteínas (FORCEVILLE, 2007).

Vários estudos têm mostrado que a oxidação do tiol e geração de radicais livres ocorre em consequência da catálise e toxicidade do selênio. Em um estudo avaliando três compostos de selênio diferentes (selenito, seleno-cistamina, e seleno-metionina) para determinar a importância relativa dos efeitos pró-oxidativos destes compostos e a sua capacidade de induzir a apoptose, demonstrou-se que além de causar um aumento na atividade da GPx, há função antioxidante nos três compostos de selênio. No entanto o selenito e seleno-cistamine induziram apoptose, enquanto a seleno-metionina não era citotóxico (STEWART et al., 1999).

A administração de altas doses de selênio foi associada com uma tendência a diminuir a mortalidade de animais com choque séptico, especialmente quando utilizado em *bolus*, achado diferente dos estudos que utilizaram administração contínua, que não tem demonstrado qualquer benefício sobre a mortalidade (FORCEVILLE, 2007). No entanto, através da avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), tióis totais, glutatona, e medições de tocoferol, a administração única de Se não conseguiu reduzir os danos dos ERO induzida pela depleção de Se (AGAY et al., 2005), Conforme demonstrado em fígado e rins de ratos após redução da ingesta (NAKANE et al., 1998). Em outro estudo, a atividade de GPx selênio-dependente também foi avaliada no fígado, rim, pulmão e sangue de camundongos. A atividade foi maior no fígado, seguido por sangue, pulmão e rim que exibiam níveis semelhantes e comparativamente mais baixos (SCHISLER; SINGH, 1988).

Quando avaliado em portadores de deficiência do selênio, o sistema de defesa antioxidante (avaliado através da atividade da glutatona) estava diretamente relacionado ao nível de selênio e a um aumento da peroxidação lipídica, uma diminuição do nível plasmático de vitamina E, e ativação de SOD. Após 24 horas de

injeção de selenito de sódio, ocorreu melhora no nível de Se no plasma e uma reativação da atividade da glutathione (AGAY et al., 2005). Compostos de organo-selênio têm uma potencial atividade semelhante tiol peroxidase (ROSA et al., 2005), porém sua atividade antioxidante pode ser explicada por outras e complexas ações, como mimetizar a glutathione peroxidase com concomitante utilização da glutathione (OGUNMOYOLE et al., 2009).

1.5 DISSELENETO DE DIFENILA

O disseleneto de difenila (PhSe_2) é um componente eletrofílico utilizado na síntese de uma variedade de compostos farmacologicamente ativos de selênio orgânico. Possui comprovadas propriedades pró-oxidantes, conforme ensaios *in vitro*, que demonstraram a interação não enzimática com o grupo tiol da glutathione (ROSA et al., 2005). No entanto existem diversas evidências que demonstram que *in vivo*, estes compostos possuem importante atividade antioxidante por melhorar a atividade da SOD (fígado e eritrócitos) e os níveis de vitamina C (fígado, rim e sangue), além do aumento dos níveis de GSH no fígado, rins e sangue, e manter inalterados os níveis de TBARS e proteínas carboniladas frente a agressões oxidantes (BARBOSA et al., 2006). No entanto, o exato e completo mecanismo desta ação antioxidante ainda não está completamente elucidado (OGUNMOYOLE et al., 2009; ROSA et al., 2007a).

A complexidade desta incógnita é em parte devido ao fato do tradicional raciocínio do PhSe_2 exercendo a sua ação antioxidante apenas imitando a GPx, com a utilização concomitante da GSH *in vitro*. Contudo, recentemente em modelos de diabetes, o PhSe_2 aumentou, contrariamente a esperada redução dos níveis de GSH (OGUNMOYOLE et al., 2009).

Uma das hipóteses é a possível mudança nos mecanismos antioxidantes do PhSe_2 devido a uma mudança no potencial hidrogeniônico (pH) (como estados de hiperglicemia) (OGUNMOYOLE et al., 2009). Visto que, a acidose aumenta a taxa de peroxidação lipídica, tanto na ausência quanto na presença de Ferro (II). O PhSe_2 reduz significativamente a produção de TBARS em todos os valores de pH estudados (5,4 até 7,8), enquanto o ebselen (um outro composto orgânico do selênio) oferece apenas uma pequena e não significativa proteção (HASSAN et al., 2009).

O efeito protetor do $(\text{PhSe})_2$ foi demonstrado frente a vários agentes agressores, dentre os quais citamos o cigarro, onde foi capaz de inibir o aumento da peroxidação lipídica, atividade do ácido Δ -aminolevulínico desidratase (ALA-D) em pulmões (LUCHESE (a) et al., 2007) e cérebro de filhotes de ratos (LUCHESE; PINTON; NOGUEIRA, 2009). O $(\text{PhSe})_2$ também reduziu o dano oxidativo no pulmão e no cérebro (LUCHESE (b) et al., 2007) além de reduzir a hepatotoxicidade (BORGES et al., 2008) induzido pelo cloreto de Cadmio em ratos. Mesmo quando utilizados outras substâncias como indutores de lesão ou de dano oxidativo, como por exemplo, o nitroprussiato de sódio, o $(\text{PhSe})_2$ tem demonstrado reduzir a peroxidação lipídica no sangue e no cérebro (POSSER et al., 2006). Achados semelhantes ocorrem no cérebro e fígado quanto ao dano induzido por um herbicida (quinclorac) (MENEZES et al., 2012), ou no fígado frente a exposição ao nitropropano (BORGES et al., 2006), sendo que muitos destes benefícios se mostraram dose dependente (BORGES et al., 2005). Em modelo animal de sepse, o $(\text{PhSe})_2$ impediu a formação de TBARS, mas não evitou a inibição da atividade ALA-D, demonstrando o potencial deste composto como um tratamento para esta patologia (PRAUCHNER; PRESTES; DA ROCHA, 2011).

O $(\text{PhSe})_2$ também demonstrou após administração por via oral, através de modulação antioxidante, reverter úlceras induzidas pelo etanol (INEU et al., 2008), além de inibir a peroxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) humana isolada *in vitro*, através da tiol-peroxidase e, impediu a oxidação de proteínas do LDL humano (BEM et al., 2008). Além da ação antioxidante, há também ação anti-mutagênica e anti-tumoral, como as propriedades anti-genotóxica do $(\text{PhSe})_2$ contra o dano oxidativo ao DNA em células cultivadas induzida pelo tamoxifeno (MELO et al., 2011). O $(\text{PhSe})_2$ além de demonstrar melhora de parâmetros bioquímicos, metabólicos e moleculares, também reduziu a mortalidade em modelo experimental de diabetes induzido por streptozotocina (independente dos níveis glicêmicos) (BARBOSA et al., 2008). Apesar de muitos estudos experimentais demonstrarem o grande potencial do selênio e de seus compostos orgânicos, em especial do $(\text{PhSe})_2$, a diferença entre a dose mínima essencial do selênio e sua dose tóxica é muito reduzida (SPALLHOZ, 1993), sendo o fígado, seguido pelo baço, rim, e coração os principais alvos da toxicidade pelo selênio e seus compostos (BARBOSA et al., 1998).

Durante seu metabolismo, há liberação de selênio livre durante o ciclo catalítico, o que pode ser problemático para o desenvolvimento destes compostos como agentes terapêuticos (DAY, 2009). Os exatos mecanismos moleculares da toxicidade do selênio ainda são objeto de estudo e discussão, há proposições de que a toxicidade do selenito poderia estar relacionada com a interação com os tióis. Enquanto outros sugerem que os efeitos tóxicos do selênio inorgânico, e também de algumas formas de selênio orgânico seja mediada pela formação de EROs, uma vez que a SOD e catalase reduzem a toxicidade destes compostos, em vários sistemas *in vitro* (BARBOSA et al., 1998; SPALLHOLZ, 1993).

Existe uma alta correlação entre os níveis diminuídos de conteúdo de GSH e de um aumento na peroxidação lipídica e danos no DNA, estabelecendo uma inter-relação entre os efeitos pró-oxidantes e genotóxicos do (PhSe)₂. O pré-tratamento com N-acetil-cisteína impediu completamente o dano oxidativo induzido por (PhSe)₂ através da manutenção dos níveis celulares de GSH, o que reforça a relação entre a depleção de GSH e danos no DNA (ROSA et al., 2005).

Existem vários efeitos tóxicos, pró-oxidantes e mutagênicos destas moléculas em bactérias, leveduras e células de mamíferos, com relatos de danos ao DNA em cérebro, fígado, rim, medula óssea, linfócitos, baço, pulmão, bexiga e testículos, todos relacionados à dose (FAVERO et al., 2005; ROSA et al., 2007a; ROSA et al., 2007b; WEIS et al., 2007). Devido aos efeitos adversos e, falta de comprovação clínica até o momento do benefício em humanos, ainda não está recomendado a suplementação em doses altas de selênio. Em 2011 foi publicado o estudo *SIGNET (Scottish Intensive care Glutamine or seleNium Evaluative Trial)* que avaliou a suplementação de Se para pacientes graves de UTI que necessitaram nutrição parenteral. Apenas pouco mais da metade dos pacientes apresentavam sepse e, a suplementação não afetou a mortalidade, apenas reduzindo o número de novas infecções naqueles que receberam suplementação de Se por mais de 5 dias (ANDREWS et al., 2011). Em maio de 2012 encerrou, porém ainda sem publicação o estudo *Trial of Glutamine and Antioxidant Supplementation in Critically Ill Patients (REDOXS)*, o que poderá elucidar um pouco mais sobre o assunto (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00133978?term=REDOX>).

O (PhSe)₂ tem demonstrado redução dos parâmetros de dano oxidativo induzidos pela sepse em ratos. A injeção pré-indução de sepse por ligação e perfuração cecal (CLP), demonstrou na avaliação de fígados, redução na formação

de TBARS, mas não evitou a inibição da ALA-D. O $(\text{PhSe})_2$ impede parcialmente o dano oxidativo induzido pela sepse, indicando a utilidade potencial deste composto no tratamento (PRAUCHNER; PRESTES; DA ROCHA, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

Sabendo da importância da sepse na mortalidade e elevados gastos no seu tratamento a nível mundial e que grande parte das estratégias utilizadas atualmente são meramente de suporte, o que limita a possibilidade de reduzir ainda mais a mortalidade por sepse e reduzir os gastos com internações em UTIs, além das sequelas tardias associadas à perda da capacidade produtiva destes pacientes, justifica-se a necessidade de maior investimento no estudo desta patologia. Nesse contexto, substâncias antioxidantes que contenham o Se poderiam ser adjuvantes na terapia contra os danos causados pela sepse. Essa abordagem poderá proporcionar resultados mais refinados que poderão ser úteis para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a sepse.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da administração de $(\text{PhSe})_2$ sob a taxa de mortalidade, bem como no dano oxidativo a proteínas em órgãos de ratos submetidos ao modelo animal de sepse.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a taxa de mortalidade em 10 dias após indução de sepse por CLP em modelo animal e administração de diferentes doses de $(\text{PhSe})_2$.

Determinar a dose de $(\text{PhSe})_2$ com melhor eficácia na redução da mortalidade após indução de sepse por CLP em modelo animal.

Determinar parâmetros de dano oxidativo a proteínas (carbonilação) em diferentes órgãos (coração, fígado, rim, baço, pulmão e quadríceps) 12 horas após indução de sepse por CLP em modelo animal e administração de $(\text{PhSe})_2$.

Determinar parâmetros de dano oxidativo a proteínas (carbonilação) em diferentes órgãos (coração, fígado, rim, baço, pulmão e quadríceps) 24 horas após indução de sepse por CLP em modelo animal e administração de $(\text{PhSe})_2$.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos, pertencentes à linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com idade entre 2 e 3 meses, pesando entre 250-300g. Foram utilizados 50 animais (10/grupo) na primeira fase, onde foi determinada a dose do (PhSe)₂ ideal através da curva de mortalidade. Na segunda fase foram utilizados 60 animais (20/grupo). Os animais foram randomizados e alojados em grupos de cinco por gaiola, com ciclo claro/escuro de 12 horas (07:00 às 19:00hs) e comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido a temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade do Sul de Santa Catarina sob o número de protocolo 12.002.06 IV.

4.2 MODELO ANIMAL DE SEPSE E TRATAMENTO

Sepse intra-abdominal foi induzida utilizando a técnica de CLP conforme previamente descrito (RITTER et al., 2004). Brevemente, os ratos foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 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 então foi perfurado com uma agulha número 14 na face anti-mesentérica do ceco, e sendo 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, foram utilizados animais submetidos à laparotomia, com manipulação do ceco, mas sem ligação ou perfuração cecal (sham).

Na primeira fase os animais foram divididos em 5 grupos (10/grupo) (Sham, CLP + veículo (óleo de soja), CLP + (PhSe)₂ 10mg/kg, CLP + (PhSe)₂ 50mg/kg, CLP + (PhSe)₂ 100mg/kg). A administração do veículo ou (PhSe)₂ nas respectivas doses ocorreu 1 hora e 12 horas após a cirurgia. Todos os animais receberam reposição volêmica com solução salina 50 ml/kg, imediatamente e 12 horas após a cirurgia, ceftriaxona 30 mg/kg (a cada 12 horas) e clindamicina 25mg/kg (a cada 6 horas) por via subcutânea até 24 horas após a cirurgia. Ainda, após o procedimento cirúrgico todos animais receberam 80 mg/kg de dipirona sódica (i.m) para analgesia (PRADO;

PONTES, 2002). Os animais foram avaliados diariamente por 10 dias para determinar a taxa de sobrevivência.

Na segunda fase, outros 60 animais foram divididos em três grupos: (1) sham + veículo (óleo de soja); (2) CLP + veículo; (3) CLP + (PhSe)₂ (50mg/kg) diluído em óleo de soja e foi administrado por via oral 1 h e 12 h após a cirurgia (ACKER et al, 2009; TAKASAGO et al, 1997). Todos os grupos receberam reposição volêmica com solução salina 50 ml/kg, imediatamente e 12 horas após a cirurgia, ceftriaxona 30 mg/kg (a cada 12 horas) e clindamicina 25mg/kg (a cada 6 horas) por via subcutânea. Ainda, após o procedimento cirúrgico todos animais receberam 80 mg/kg de dipirona sódica (i.m) para analgesia (PRADO; PONTES, 2002). Doze e 24 horas após a cirurgia, os animais foram eutanasiados e baço, coração, fígado, pulmão, rim e quadríceps foram removidos para análise bioquímica.

4.3 DETERMINAÇÃO DA CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS

Foi determinado o dano oxidativo (em proteínas) nos ratos mortos 12 e 24 horas após a indução de sepse nos órgãos (baço, coração, fígado, pulmão, rim e quadríceps). Como índice de dano oxidativo em proteínas foi determinado pela medida das proteínas carboniladas conforme previamente descrito (LEVINE et al, 1990). As amostras obtidas eram precipitadas e as proteínas dissolvidas com dinitrofenilidrazina. Os grupamentos carbonil eram determinados pela absorbância em 370nm.

4.4 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

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

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

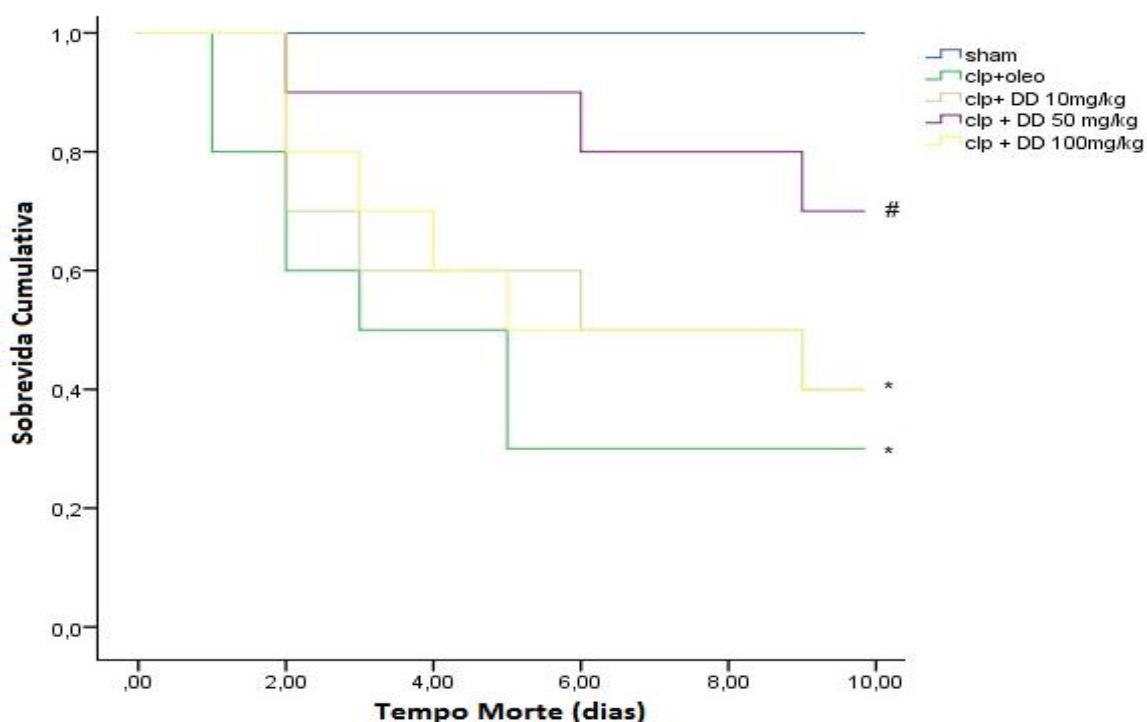
Todos os dados foram apresentados como média e desvio padrão. Dados bioquímicos foram analisados por ANOVA e múltiplas comparações por Newman Keuls. A curva de sobrevivência dos diferentes grupos foi comparada por teste log-rank. As análises estatísticas foram realizadas no SPSS versão 19.0, sendo

considerado significativo o valor de $p < 0,05$. O número de animais em cada grupo foi baseado em estudos pré-clínicos e clínicos prévios, para uma diferença de até 20% nos parâmetros a serem analisados entre os grupos, com uma variância de no máximo 10% entre as médias e calculou-se um tamanho de amostra, para um erro alfa de 0,05 e um poder de 80%.

5 RESULTADOS

No presente estudo nós avaliamos a sobrevivência de ratos Wistar submetidos à sepse por CLP e tratados com diferentes doses (10, 50 e 100mg/kg) de $(\text{PhSe})_2$. Com isso, nós observamos na **Figura 1** que os animais tratados com $(\text{PhSe})_2$ na dose de 50mg/kg tiveram uma redução significativa da mortalidade dos animais quando comparado aos ratos submetidos a CLP sem tratamento com $(\text{PhSe})_2$. No entanto, as doses de 10 e 100mg/kg não apresentaram redução significativa na mortalidade.

Figura 1 – Curva de sobrevivência de acordo com a dose de $(\text{PhSe})_2$



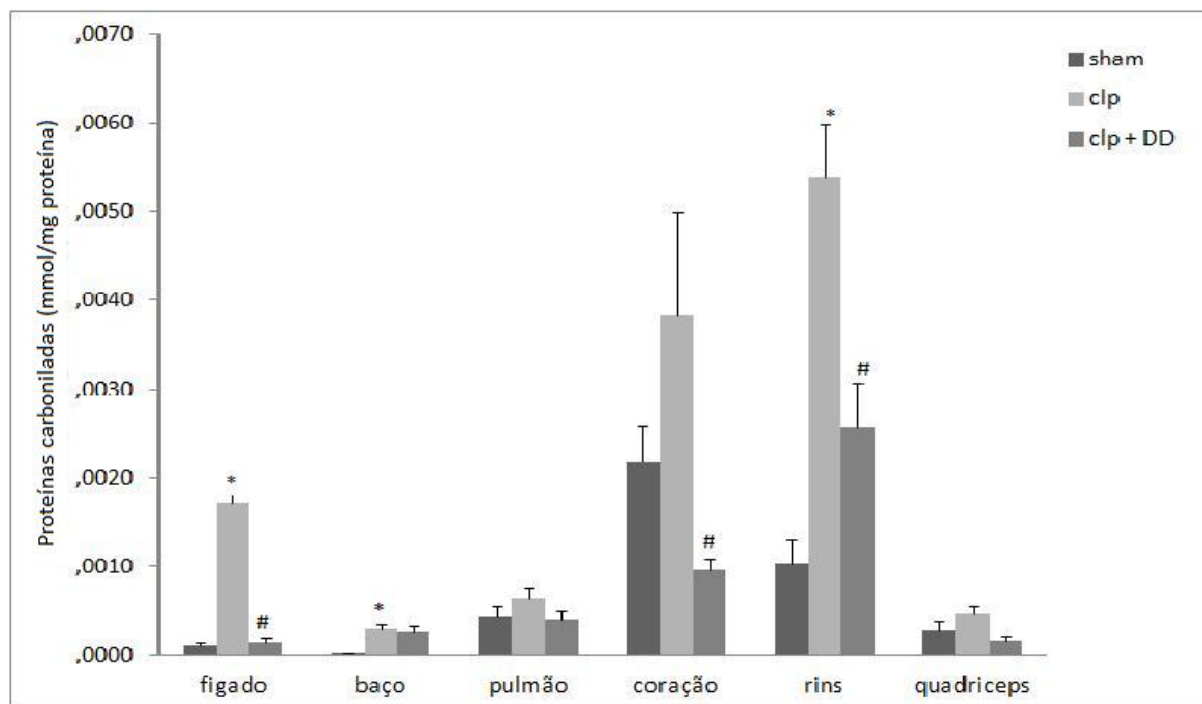
Legenda: Os valores foram expressos com média $\pm$ desvio padrão. * Diferença significativa quando comparado ao grupo sham. # Diferença significativa quando comparado ao grupo CLP. (ANOVA de uma via seguido de Tukey: $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração do autor, 2012

Além disso, nós avaliamos o dano oxidativo a proteínas no fígado, baço, pulmão, coração, rim e quadríceps de ratos 12 e 24 horas após a CLP e tratados com 50mg/kg de $(\text{PhSe})_2$. Assim nós demonstramos na **Figura 2** que após 12 horas da indução de sepse houve carbonilação de proteínas no fígado, baço e rim quando comparado ao grupo sham. No entanto, no pulmão, coração e quadríceps não houve diferença significativa. Além disso, o tratamento com $(\text{PhSe})_2$ foi capaz de reverter o

dano oxidativo a proteínas no fígado e rim, bem como diminuir a carbonilação de proteínas no coração. No baço, o $(\text{PhSe})_2$ não reverteu o dano causado.

Figura 2 – Concentração de proteínas carboniladas em órgãos de ratos 12 horas após a indução de sepse e tratados com $(\text{PhSe})_2$.

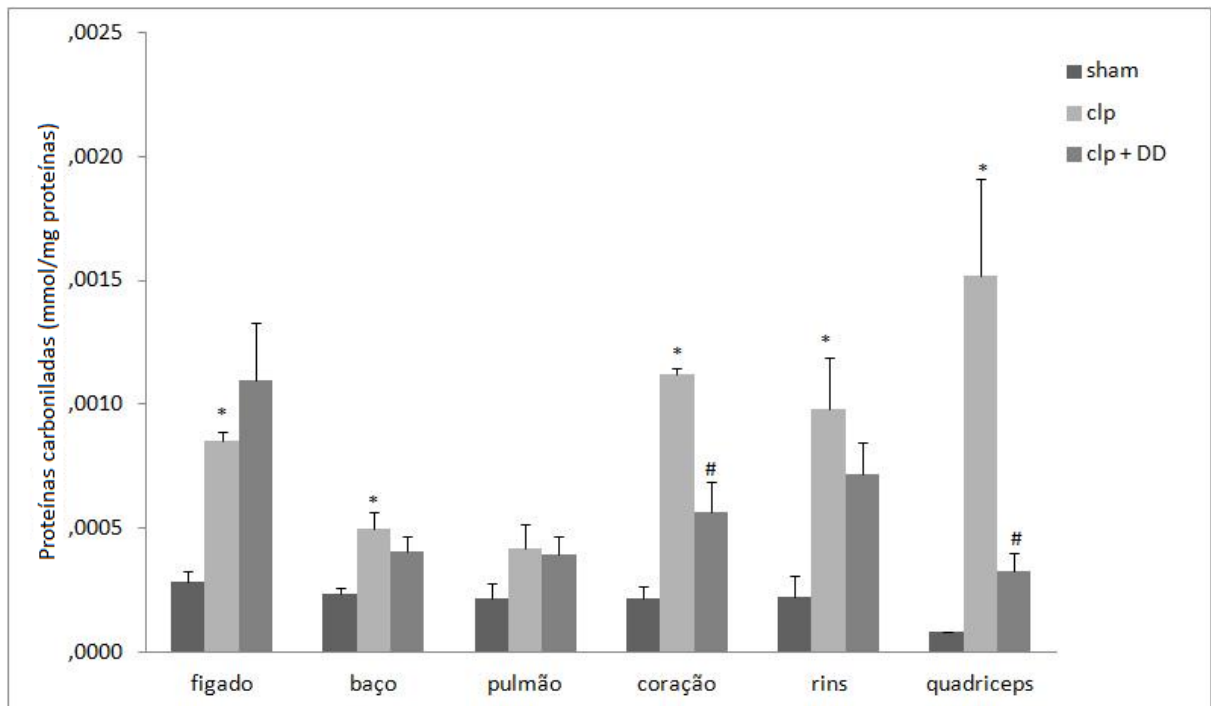


Legenda: Os valores foram expressos com média $\pm$ desvio padrão. * Diferença significativa quando comparado ao grupo sham. # Diferença significativa quando comparado ao grupo CLP. (ANOVA de uma via seguido de Tukey: $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração do autor, 2012.

Na **Figura 3** nós demonstramos que 24 horas após a indução de sepse por CLP houve carbonilação de proteínas no fígado, baço, rim, coração e quadríceps quando comparado ao grupo sham. No entanto, no pulmão não houve diferença significativa. Porém, o tratamento com $(\text{PhSe})_2$ foi capaz de reverter o dano oxidativo a proteínas apenas no coração e quadríceps. Sendo que o dano causado nos outros órgãos não foi revertido com o uso de $(\text{PhSe})_2$ na dose de 50mg/kg.

Figura 3 – Concentração de proteínas carboniladas em órgãos de ratos 24 horas após a indução de sepse e tratados com $(\text{PhSe})_2$.



Legenda: Os valores foram expressos com média $\pm$ desvio padrão. * Diferença significativa quando comparado ao grupo sham. # Diferença significativa quando comparado ao grupo CLP. (ANOVA de uma via seguido de Tukey: $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração do autor, 2012

6 DISCUSSÃO

No presente estudo nós avaliamos a capacidade do $(\text{PhSe})_2$, um composto orgânico de selênio, em reduzir a mortalidade de ratos submetidos a sepse por CLP e reverter o dano oxidativo a proteínas em diferentes órgãos destes animais. Para este estudo foi utilizado 50mg/kg de $(\text{PhSe})_2$, visto que em um estudo preliminar os animais submetidos a sepse e tratados com esta dose tiveram uma redução significativa da mortalidade em relação aos animais submetidos a sepse sem tratamento por um período de 10 dias (70% versus 30% na taxa de sobrevivência). No entanto, os animais tratados com 10 mg/Kg ou 100 mg/Kg de $(\text{PhSe})_2$ não demonstraram aumento significativo da sobrevivência nesta mesma fase do estudo. Diante deste resultado acredita-se que a dose de 10mg/kg não foi suficiente para desenvolver um efeito terapêutico e a dose de 100mg/kg pode ter apresentado um efeito tóxico.

O dano oxidativo a proteínas foi avaliado no fígado, baço, pulmão, coração, rim e quadríceps de ratos 12 e 24 horas após a indução de sepse. Neste sentido, 12 horas após a cirurgia nós observamos a presença de proteínas carboniladas no fígado, baço e rim quando comparado ao grupo controle. No entanto, o tratamento com $(\text{PhSe})_2$ foi capaz de reverter o dano oxidativo a proteínas no fígado e rim, bem como reduzir a carbonilação de proteínas no coração em relação ao grupo CLP. No baço, o $(\text{PhSe})_2$ não reverteu o dano causado. Após 24 horas da cirurgia nós observamos que a presença de proteínas carboniladas manteve-se elevada no fígado, baço e rim, bem como no coração e quadríceps. Porém o tratamento com $(\text{PhSe})_2$ acarretou na reversão do dano oxidativo a proteínas apenas no coração e quadríceps.

A análise do dano oxidativo foi realizada através da avaliação das proteínas carboniladas pela técnica descrita por Levine em 1990. Neste estudo nós mensuramos as proteínas carboniladas por apresentar vantagens sobre outros métodos (formação precoce, estabilidade e reprodutibilidade) na avaliação do dano oxidativo (NOEMAN; HAMOODA; BAALASH, 2011). A adição do radical carbonila em proteínas pode ocorrer através de vários mecanismos, tais como clivagem oxidativa de proteínas (oxidação direta da lisina, arginina, resíduos de prolina e treonina), reação com os produtos de peroxidação lipídica aldeídica (por exemplo, hidroxinonenal, malondialdeído) ou por meio de reações de glicação ou glicoxidação

(COCKELL; BELONJE, 2002). Além da formação precoce, a estabilidade das proteínas carboniladas é de suma importância, pois demoram de horas a dias para serem degradadas, enquanto os produtos da peroxidação lipídica são degradados em minutos (DALLE-DONNE et al, 2003), o que permite a sua utilização inclusive nos estudos de envelhecimento (ANDRADES et al, 2005), sendo realmente um indicador geral e, de longe, o marcador mais comumente usado de oxidação de proteínas. Outro fator importante é não necessitar de equipamentos específicos, além dos normalmente disponíveis em laboratórios de bioquímica (DALLE-DONNE et al, 2003).

A sepse, com toda a sua repercussão clínica e complexa fisiopatologia demanda inúmeros estudos para permitir avaliar de forma precisa quais os mecanismos e fatores interferem nas diversas vias metabólicas, de sinalização e desfechos. Estes estudos em humanos são limitados, devido à necessidade de intervenções rápidas no intuito de reduzir a morbi-mortalidade (GAO et al, 2005). Estas intervenções levam a uma limitação da perfeita elucidação de todos os fatores envolvidos na sua fisiopatologia. Considerando esta realidade, os estudos em modelos animais, que podem utilizar grupos controle, têm extrema importância, pois torna possível estudar e avaliar diversas intervenções diagnósticas e terapêuticas. No entanto, para a correta avaliação, necessitamos definir não somente o organismo como um todo, mas também definir o perfil em cada órgão individualmente. Esta análise dos órgãos individualmente nos permitirá elaborar hipóteses a partir de particularidades de cada tecido e, desta forma ajustar as terapias para uma maior eficácia (BARICHELLO et al., 2006). A hipótese da resposta “individual” de cada órgão explica o porquê que os antioxidantes ainda não conseguiram reduzir efetivamente os desfechos desfavoráveis em pacientes com sepse, apesar de extensa literatura demonstrar a interferência do estresse oxidativo na fisiopatologia da doença (RITTER et al., 2004; ZHANG; GO; JONES, 2007) e, estudos com diversos antioxidantes tais como n-acetilcisteína (SPRONG et al., 1998), alfa-tocoferol (POWELL et al., 1991), deferoxamina (VULCANO; MEISS; ISTURIZ, 2000) em modelos animais já terem demonstrado redução da mortalidade em modelos animais. O perfil diferente nos diversos órgãos pode significar a necessidade de uma intervenção adjuvante com o intuito de modificar o comportamento em determinado órgão específico para otimizar a sobrevivência do organismo como um todo (BARICHELLO et al., 2006).

Também se têm sugerido que a oxidação da proteína não seja somente um marcador de dano oxidativo, mas também um fator causal de lesão oxidativa. O dano oxidativo a proteínas pode ser um evento patológico mais crítico do que os danos aos lipídeos, porque a inativação de enzimas pode ter efeitos rápidos e desproporcionais, pela natureza das funções catalíticas das enzimas (COCKELL; BELONJE, 2002). O tempo e a magnitude da carbonilação de proteínas estão relacionados com a gravidade do modelo de sepse, sendo uma importante pista para conceber novas estratégias de tratamento para a sepse (ANDRADES et al, 2005).

Em estudo observacional em humanos, a dosagem de proteínas carboniladas em 24, 48 e 72 horas foi maior em pacientes sépticos não sobreviventes do que nos sobreviventes. Contudo, no momento do diagnóstico não diferenciou entre os sobreviventes e não sobreviventes, apenas entre sépticos e controles (LUCHTEMBERG et al., 2008), pois diferentemente dos trabalhos experimentais, o tempo do início do insulto desencadeante foi variável. Por isso, o modelo utilizado foi baseado em modelo já validado (CASSOL et al., 2010) na avaliação de outras substâncias antioxidantes, com algumas modificações para permitir uma melhor definição da curva correspondente ao dano oxidativo, sendo utilizadas as medidas realizadas com 12 e 24 horas após a indução da sepse polimicrobiana pela CLP conforme descrito por Ritter (2004).

A análise de danos mais tardia é limitada pela elevada taxa de mortalidade após 12 horas conforme relatado por Andrades et al. (2005). A oferta do antioxidante apenas 1 e 12 horas após o desencadeamento do processo imuno-inflamatório pela técnica CLP, tenta reproduzir o mais próximo da realidade clínica, visto que o pré-tratamento é possível apenas em estudos experimentais (RITTER et al., 2004; VULCANO; MEISS; ISTURIZ, 2000), como encontrado no estudo de Sener et cols (2005), que apresentou importante redução do dano oxidativo em diversos órgãos de animais submetidos a sepse com o pré-tratamento por 10 dias.

As doenças hepáticas continuam sendo um dos problemas de saúde mais graves, e medicamentos modernos têm pouco a oferecer para a redução de doenças hepáticas (OLIBONI et al., 2011), não possuindo ainda uma terapia substitutiva efetiva. Em nosso estudo, o $(\text{PhSe})_2$ conseguiu reverter o dano oxidativo no fígado apenas após 12 horas do indução de sepse, semelhante ao achado por Prauchner, Prestes e Da Rocha (2011), em que os animais receberam pré-

tratamento com $(\text{PhSe})_2$. Porém, após 24 horas da indução de sepse o $(\text{PhSe})_2$ não conseguiu manter esta ação antioxidante, o que pode ser secundário a necrose hepática que não está presente 12 horas após a CLP, sendo significativa apenas 24 horas após CLP (ZAPELINI et al., 2008). No entanto, no baço o dano oxidativo foi significativo em 12 e 24 horas após a cirurgia semelhante ao encontrado por Cassol et cols (2010) com 6h e 10 dias de evolução, no entanto, o $(\text{PhSe})_2$ não demonstrou ação antioxidante significativa, diferentemente do achado de Cassol et cols (2010) com canabidiol.

Nos pulmões não ocorreu dano oxidativo significativo a proteínas, como também não ocorreu reversão deste com o uso do $(\text{PhSe})_2$, contrariando estudos prévios que demonstrarão elevações de até 58% na concentração de proteínas carboniladas em modelos experimentais de SIRS (RODRIGO; TRUJILLO; BOSCO, 2006) ou de CLP (COSKUN et al., 2011). O estresse oxidativo pode estar envolvido na mediação de alterações pulmonares funcionais, bioquímicas e ultraestruturais, como aumento da peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, suportado por numerosas observações clínicas de doenças humanas, assim como vários modelos animais. Estes estudos demonstraram um papel importante do estresse oxidativo no mecanismo de lesão pulmonar inflamatória, independente do meio do insulto (sanguíneo ou diretamente pelas vias aéreas) (RODRIGO; TRUJILLO; BOSCO, 2006).

No coração ocorreu elevação significativa da carbonilação de proteínas apenas 24 horas após a indução de sepse, porém houve uma ação antioxidante do $(\text{PhSe})_2$ tanto 12 horas quanto 24 horas após a lesão. O coração é conhecido por ter um baixo potencial antioxidante e pequena capacidade para elevar as defesas antioxidantes e reparar os danos oxidativos. O dano oxidativo secundário às ERO no coração leva à perda da integridade da membrana celular e pode levar a arritmias cardíacas, redução da contratilidade, infarto, insuficiência cardíaca ou morte súbita. A sobrecarga mecânica induz aumento no consumo de oxigênio pelo músculo e acelera o fluxo de elétrons na mitocôndria pelo aumento da necessidade de ATP. Isto acarreta maior produção de ERO e do ânion superóxido (NOEMAN; HAMOODA; BAALASH, 2011), pois o coração adulto produz e consome uma massa equivalente diária de ATP 5 vezes maior que a sua própria massa para a manutenção da homeostase iônica celular e contrações rítmicas (SHAO et al., 2010). Portanto, o coração com sua elevada taxa metabólica pode ter uma maior

susceptibilidade aos estímulos pró-oxidantes, o que pode explicar redução da carbonilação de proteínas após 12 e 24 horas da indução de CLP (KALAZ et al., 2012).

No rim, o dano oxidativo foi significativo 12 e 24 horas após a indução de sepse, porém semelhante ao fígado, o (PhSe)₂ demonstrou capacidade de reverter o dano apenas na fase inicial (12 horas), não mantendo de forma significativa esta redução na fase tardia (24 horas). Conforme demonstrado previamente, o dano renal em modelo de endotoxemia em ratos apresenta, além da alteração hemodinâmica e disfunção renal (função excretora), também dano oxidativo devido à formação de superóxido em excesso, que pode perpetuar e estimular maior dano oxidativo, e explicar a perda da ação antioxidante na fase tardia (YANG et al., 2007).

Na avaliação do quadríceps, não houve dano oxidativo a proteínas significativo, pela avaliação da carbonilação das proteínas 12 horas após a cirurgia. Esta diferença em relação ao miocárdio pode ser derivada do seu menor metabolismo (SHAO et al., 2010) apesar da estrutura estriada semelhante. Porém ocorreu aumento significativo do dano oxidativo a proteínas 24 horas após, com reversão do (PhSe)₂, semelhante ao miocárdio. Os achados na fase inicial reforçam a hipótese de maior resistência da mitocôndria deste músculo ao dano oxidativo induzido pela sepse conforme descrito por Peruchi et al. (2011), porém na fase mais tardia esta resistência não se manteve, diferente do estudo anterior. Esta discrepância pode ser devido ao fato que no estudo anterior havia sido analisado o dano aos lipídeos e, agora avaliamos dano a proteínas (mais estáveis) (NOEMAN; HAMOODA; BAALASH, 2011).

Diante dos nossos resultados e evidências da literatura, nós sugerimos que o uso de 50mg/kg de (PhSe)₂ reduz a mortalidade dos animais devido a sua ação antioxidante. Além disso, podemos observar que 12 e 24 horas após CLP, o dano oxidativo a proteínas foi significativo apenas em alguns órgãos, como também a capacidade de reversão deste dano pelo uso do antioxidante. Isto demonstra a necessidade de estudos específicos em cada órgão e, não apenas análise sistêmica, com possíveis terapias adjuvantes para aperfeiçoar a ação em cada órgão individualmente e, conseqüentemente potencializar a ação sistêmica.

7 CONCLUSÃO

Com este estudo nós demonstramos que o uso de $(\text{PhSe})_2$ na dose de 50mg/kg reduziu a mortalidade dos animais submetidos a sepse por CLP, enquanto que na dose de 10mg/kg e 100mg/kg a mortalidade permaneceu elevada. Ainda, observamos a presença de carbonilação de proteínas no fígado, baço e rim 12 horas após a indução de sepse. Sendo que, o $(\text{PhSe})_2$ apresentou efeito antioxidante no fígado, rim e coração. Por fim, nós mostramos dano oxidativo a proteínas no fígado, baço, coração, rim e quadríceps 24 horas após a CLP. No entanto, o $(\text{PhSe})_2$ reverteu apenas o dano no coração e quadríceps.

REFERÊNCIAS

- Abraham E, Matthay MA, Dinarello CA, Vincent JL, Cohen J, Opal SM, et al. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. *Crit Care Med*. 2000;28(1):232-35.
- 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.
- Agay D, Sandre C, Ducros V, Faure H, Cruz C, Alonso A, et al. Optimization of selenium status by a single intraperitoneal injection of Se in Se-deficient rat: possible application to burned patient treatment. *Free Radic Biol Med*. 2005;39(6):762-8.
- Andrades M, Ritter C, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Oxidative parameters differences during non-lethal and lethal sepsis development. *J Surg Res*. 2005;125(1):68-72.
- Andrews PJD, Avenell A, Noble DW, Campbell MK, Croal BL, Simpson WG, et al. Randomised trial of glutamine, selenium, or both, to supplement parenteral nutrition for critically ill patients. *BMJ* 2011;342:d1542
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001;29(7):1303-10.
- Arrigo AP. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(9-10):936-44.
- Barbosa NB, Rocha JB, Zeni G, Emanuelli T, Beque MC, Braga AL. Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinate dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998;149(2):243-53.
- Barbosa NB, Rocha JB, Wondracek DC, Perottoni J, Zeni G, Nogueira CW. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. *Chem Biol Interact*. 2006;163(3):230-8.
- Barbosa NB, Rocha JB, Soares JC, Wondracek DC, Gonçalves JF, Schetinger MR, et al. Dietary diphenyl diselenide reduces the STZ-induced toxicity. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(1):186-94.
- 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.
- Behne D, Kyriakopoulos A. Identification of type I iodothyronine 59-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1990;173:1143–1149.

Bem AF, Farina M, Portella Rde L, Nogueira CW, Dinis TC, Laranjinha JA et al. Diphenyl diselenide, a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation in vitro. *Atherosclerosis*. 2008;201(1):92-100.

Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. 1997;272(33):20313-6.

Bock, A, Forchhammer JH, Leinfelder W, Sawers G, Vepreck B, Zinoni F. Selenocysteine: The 21st amino acid. *Mol. Microbiol*. 1991; 5:515–520.

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 Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992;101(6):1644-55.

Borges LP, Borges VC, Moro AV, Nogueira CW, Rocha JB, Zeni G. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. *Toxicology*. 2005;210(1):1-8.

Borges LP, Brandão R, Godoi B, Nogueira CW, Zeni G. Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. *Chem Biol Interact*. 2008;171(1):15-25

Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*. 2002;360(9328):219-23.

Brealey D, Singer M. Mitochondrial Dysfunction in Sepsis. *Curr Infect Dis Rep*. 2003;5(5):365-71.

Brealey DA. et al. Recovery from organ failure is associated with improved mitochondrial function in septic patients. *Intensive Care Med*. 2003;29,s.134.

Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;286(3):491-7.

Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, et al. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *Jama*. 1995;274(12):968-74.

Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B, EPISEPSIS Study Group. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med*. 2004;30(4):580-8.

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

Cipolle MD, Pasquale MD, Cerra FB. Secondary organ dysfunction. From clinical perspectives to molecular mediators. *Crit Care Clin.* 1993;9(2):261-98.

Cockell KA, Belonje B. The carbonyl content of specific plasma proteins is decreased by dietary copper deficiency in rats. *J Nutr.* 2002;132(9):2514-8.

Coskun AK, Yigiter M, Oral A, Odabasoglu F, Halici Z, Menten O, et al. The effects of montelukast on antioxidant enzymes and proinflammatory cytokines on the heart, liver, lungs, and kidneys in a rat model of cecal ligation and puncture-induced sepsis. *ScientificWorldJOURNAL.* 2011;11:1341-56.

Crouser ED, Julian MW, Blaho DV, Pfeiffer DR. Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity. *Crit Care Med.* 2002;30(2):276-84.

Crouser ED. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion.* 2004;4(5-6):729-41.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003;329(1-2):23-38.

Day BJ. Catalase and glutathione peroxidase mimics. *Biochem Pharmacol.* 2009;77(3):285-96.

Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med.* 2008;34:17-60.

Dias F, Eidt M, Duquia R, Stribghi F, Schwartzman C, Sztiler F, et al. Clinical factors associated with mortality in sepsis shock. *Crit Care.* 2007;11:P20.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.

Favero AM, Weis SN, Stangherlin EC, Zeni G, Rocha JB, Nogueira CW. Teratogenic effects of diphenyl diselenide in Wistar rats. *Reprod Toxicol.* 2005;20(4):561-8.

Ferrier D. Septicaemia and the Catheter. *Br Med J.* 1973;642:429-30.

Flohe L, Günzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 1973;32(1):132-4.

Forceville X. Effects of high doses of selenium, as sodium selenite, in septic shock patients a placebo-controlled, randomized, double-blind, multi-center phase II study--selenium and sepsis. *J Trace Elem Med Biol* 2007;21(1):62-5.

Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth.* 2011;107(1):57-64.

Gao F, Melody T, Daniels DF, Giles S, Fox S. The impact of compliance with 6-hour and 24-hour sepsis bundles on hospital mortality in patients with severe sepsis: a prospective observational study. *Crit Care*. 2005;9(6):764-70.

Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*. 1995;41:1819-28.

Gutteridge JM, Mitchell J. Redox imbalance in the critically ill. *Br Med Bull*. 1999;55(1):49-75.

Harrison I, Littlejohn D, Fell GS. Distribution of selenium in human blood plasma and serum. *Analyst*. 1996;121:189–94.

Hassan W, Ibrahim M, Nogueira CW, Ahmed M, Rocha JB. Effects of acidosis and Fe (II) on lipid peroxidation in phospholipid extract: Comparative effect of diphenyldiselenide and ebselen. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009;28(1):152-4.

Ineu RP, Pereira ME, Aschner M, Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(9):3023-9.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE. Campanha Sobrevivendo a sepse, Relatório Nacional. São Paulo: nov. 2011 Disponível em: <<http://www.sepsisnet.org>> Acesso em: 10 maio 2012.

James AM, Murphy MP. How mitochondrial damage affects cell function. *J Biomed Sci*. 2002;9(6):475-87.

Kakkar P, Singh BK. Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control. *Mol Cell Biochem*. 2007;305(1-2):235-53.

Kalaz EB, Evran B, Develi-Is S, Vural P, Dogru-Abbasoglu S, Uysal M. Effect of carnosine on prooxidant-antioxidant balance in several tissues of rats exposed to chronic cold plus immobilization stress. *J Pharmacol Sci*. 2012;120(2):98-104.

Kortgen A, Niederprüm P, Bauer M. Implementation of an evidence-based “standard operating procedure” and outcome in septic shock. *Crit Care Med*. 2006;34(4):943-49.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol*. 1990;186:464–78.
Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions. *Crit Care Med*. 2003;31(4):1250-56.

Lowes DA, Galley HF. Mitochondrial protection by the thioredoxin-2 and glutathione systems in an in vitro endothelial model of sepsis. *Biochem J*. 2001;436(1):123-32.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265–75.

Luchese (a) C, Stangherlin EC, Ardais AP, Nogueira CW, Santos FW. Diphenyl diselenide prevents oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in lung of rat pups. *Toxicology*. 2007;230(2-3):189-96.

Luchese (b) C, Brandão R, de Oliveira R, Nogueira CW, Santos FW. Efficacy of diphenyldiselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. *Toxicol Lett*. 2007;173(3):181-90.

Luchese C, Pinton S, Nogueira CW. Brain and lungs of rats are differently affected by cigarette smoke exposure: antioxidant effect of anorganoselenium compound. *Pharmacol Res*. 2009;59(3):194-201.

Luchtemberg MN, Petronilho F, Constantino L, Gelain DP, Andrades M, Ritter C, et al. Xanthine oxidase activity in patients with sepsis. *Clin Biochem*. 2008;41(14-15):1186-90.

Marik P, Varon J. The Management of Sepsis. In: IRWIN, Richard S.; RIPPE, James. *Irwin and Rippe's Intensive Care Medicine*. 6 ed., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2008, cap 163, p. 1855-69.

Martin G. Epidemiology studies in critical care. *Crit Care*. 2006;10(2):136.

Melo MT, Oliveira IM, Grivicich I, Guecheva TN, Saffi J, Henriques JAP, et al. Diphenyl diselenide protects cultured MCF-7 cells against tamoxifen-induced oxidative DNA damage. *Biomed Pharmacother*. 2012; In Press: doi:10.1016/j.biopha.2011.09.012

Menezes CC, Leitemperger J, Santi A, Lópes T, Veiverberg CA, Peixoto S et al. The effects of diphenyl diselenide on oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to herbicide quinclorac (Facet®). *Ecotoxicol Environ Saf*. 2012;81:91-7.

Mills CD, Caldwell MD, Gann DS. Evidence of a plasma-mediated " windows " of immunodeficiency in rats following trauma. *J Clin Immunol*. 1989;9:139-50.

Mishra V. Oxidative stress and role of antioxidant supplementation in critical illness. *Clin Lab*. 2007;53(3-4):199-209.

Moore FA, Moore EE, Read RA. Postinjury multiple organ failure: role of extratoracic injury and sepsis and adult respiratory distress syndrome. *New Horiz*. 1993;1:539-49.

Nakane T, Asayama K, Kodera K, Hayashibe H, Uchida N, Nakazawa S. Effect of selenium deficiency on cellular and extracellular glutathione peroxidases: immunochemical detection and mRNA analysis in rat kidney and serum. *Free Radic Biol Med*. 1998;25(4-5):504-11.

Nathan AT, Singer M. The oxygen trail: tissue oxygenation. *Br Med Bull*. 1999;55(1):96-108.

Noeman SA, Hamooda HE, Baalash AA. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetol Metab Syndr*. 2011;3(1):17.

Ogunmoyole T, Rocha JB, Okoronkwo AE, Kade IJ. Altered pH homeostasis modulates the glutathione peroxidase mimics and other antioxidant properties of diphenyldiselenide. *Chem Biol Interact*. 2009;182(2-3):106-11.

Oliboni LS, Dani C, Funchal C, Henriques JA, Salvador M. Hepatoprotective, cardioprotective, and renal-protective effects of organic and conventional grapevine leaf extracts on Wistar rat tissues. *An Acad Bras Cienc*. 2011;83(4):1403-11.

Ozawa T. Mitochondrial genome mutation in cell death and aging. *J Bioenerg Biomembr*. 1999;31(4):377-90.

Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999;18(49):6853-66.

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;167(2):333-8.

Posser T, Moretto MB, Dafre AL, Farina M, da Rocha JB, Nogueira CW et al. Antioxidant effect of diphenyl diselenide against sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation in human platelets and erythrocyte membranes: an in vitro evaluation. *Chem Biol Interact*. 2006;164(1-2):126-35

Powell RJ, Machiedo GW, Rush BF Jr, Dikdan GS. Effect of oxygen-free radical scavengers on survival in sepsis. *Am Surg*. 1991;57(2):86-8.

Prado WA, Pontes RM. Presurgical ketoprofen, but not morphine, dipyrone, diclofenac or tenoxicam, preempts post-incisional mechanical allodynia in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35:111-119.

Prauchner CA, Prestes A, Da Rocha JB. Effects of diphenyl diselenide on oxidative stress induced by sepsis in rats. *Pathol Res Pract*. 2011;207(9):554-8.

Rinaldi S, Landucci F, De Gaudio AR. Antioxidant therapy in critically septic patients. *Curr Drug Targets*. 2009;10(9):872-80.

Ritter C, Andrades M, Reinke A, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Drug intervention trials in sepsis. *Lancet*. 2004;364(9433):498.

Rodrigo R, Trujillo S, Bosco C. Biochemical and ultrastructural lung damage induced by rhabdomyolysis in the rat. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006;231(8):1430-8.

Rosa RM, de Oliveira RB, Saffi J, Braga AL, Roesler R, Dal-Pizzol F, et al. Pro-oxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions. *Life Sci*. 2005;77(19):2398-411.

Rosa RM, Hoch NC, Furtado GV, Saffi J, Henriques JA. DNA damage in tissues and organs of mice treated with diphenyl diselenide. *Mutat Res.* 2007a;633(1):35-45.

Rosa RM, do Nascimento Picada J, Saffi J, Henriques JA. Cytotoxic, genotoxic, and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts. *Mutat Res.* 2007b;628(2):87-98.

Salvo I, de Cian W, Musicco M, Langer M, Piadena R, Wolfler A, et al. The Italian sepsis study: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med.* 1995;21(2):244-49.

Schisler NJ, Singh SM. Modulation of selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GSH-Px) activity in mice. *Free Radic Biol Med.* 1988;4(3):147-53.

Sebat F, Johnson D, Musthafa AA, Watnik M, Moore S, Henry K, et al. A Multidisciplinary Community Hospital Program for Early and Rapid Resuscitation of Shock in Nontrauma Patients. *Chest.* 2005;127(5):1729-43.

Sener G, Toklu H, Ercan F, Erkanli G. Protective effect of beta-glucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Int Immunopharmacol.* 2005;5(9):1387-96

Shao CH, Rozanski GJ, Nagai R, Stockdale FE, Patel KP, Wang M, et al. Carbonylation of myosin heavy chains in rat heart during diabetes. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(2):205-17.

Shapiro NI, Howell MD, Talmor D, Lahey D, Ngo L, Buras J, et al. Implementation and outcomes of the Multiple Urgent Sepsis Therapies (MUST) protocol. *Crit Care Med.* 2006;34(4):1025-32.

Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care.* 2004;8(4):251-60.

Spallholz, JE. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radical Biol. Med.* 1993;17: 45–64.

Sprong RC, Winkelhuyzen-Janssen AM, Aarsman CJ, van Oirschot JF, van der Bruggen T, van Asbeck BS. Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(4):1283-93.

Stewart MS, Spallholz JE, Neldner KH, Pence BC. Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(1-2):42-8.

Talmor D, Greenberg D, Howell MD, Lisbon A, Novack V, Shapiro N. The costs and cost-effectiveness of an integrated sepsis treatment protocol. *Crit Care Med.* 2008;36:1168-74.

Takasago T, Peters EE, Graham DI, Masayasu H, Macrae IM. 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(6):1251-6.

Trzeciak S, Dellinger RP, Abate NL, Cowan RM, Stauss M, Kilgannon JH, et al. Translating Research to Clinical Practice: a 1-year experience with implementing early goal-directed therapy for septic shock in the emergency department. *Chest.* 2006;129(2):225-32.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552:335-44.

Ursini F, Maorino M, Valente M, Ferri K, Gregolin C. Purification of pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxidase. *Biochem. Biophys. Acta.* 1982;710:197-211.

Van Remmen H, Richardson A. Oxidative damage to mitochondria and aging. *Exp Gerontol.* 2001;36(7):957-68.

Vanhorebeek I, De Vos R, Mesotten D, Wouters PJ, De Wolf-Peeters C, Van den Berghe G. Protection of hepatocyte mitochondrial ultrastructure and function by strict blood glucose control with insulin in critically ill patients. *Lancet.* 2005;365(9453):53-9.

Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med.* 2006;34(2):344-53.

Victor VM, Rocha M, De la Fuente M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int Immunopharmacol.* 2004;3:327-47.

Vulcano M, Meiss RP, Isturiz MA. Deferoxamine reduces tissue injury and lethality in LPS-treated mice. *Int J Immunopharmacol.* 2000;22(8):635-44.

Warren HS. Strategies for the treatment of sepsis. *New Engl J Med.* 1997;336:952-53.

Weis SN, Favero AM, Stangherlin EC, Manarin FG, Rocha JB, Nogueira CW et al. Repeated administration of diphenyl diselenide to pregnant rats induces adverse effects on embryonic/fetal development. *Reprod Toxicol.* 2007;23(2):175-81.

Yang CC, Ma MC, Chien CT, Wu MS, Sun WK, Chen CF. Hypoxic preconditioning attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat kidneys. *J Physiol.* 2007;582(1):407-19.

Yassen KA, Galley HF, Lee A, Webster NR. Mitochondrial redox state in the critically ill. *Br J Anaesth.* 1999;83(2):325-7.

Zapelini PH, Rezin GT, Cardoso MR, Ritter C, Klamt F, Moreira JC, et al. Antioxidant treatment reverses mitochondrial dysfunction in a sepsis animal model. *Mitochondrion*. 2008;8(3):211-8.

Zhang H, Go YM, Jones DP. Mitochondrial thioredoxin-2/peroxiredoxin-3 system functions in parallel with mitochondrial GSH system in protection against oxidative stress. *Arch Biochem Biophys*. 2007;465(1):119-26.

Zimmerman JJ. Defining the role of oxyradicals in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care Med*. 1995;23(4):616-7.