Marco Antonio de Souza Brito

Estudo do estado oxidante e antioxidante na sepse de
origem peritoneal em animais submetidos a tolerância pelo
lipopolissacarídeo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano

São Paulo

2018

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de
2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

Marco Antonio de Souza Brito

Estudo do estado oxidante e antioxidante na sepse de
origem peritoneal em animais submetidos a tolerância pelo
lipopolissacarídeo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Brito, Marco Antonio de Souza

Estudo do estado oxidante e antioxidante na
sepse de origem peritoneal em animais submetidos a
tolerância pelo lipopolissacarídeo / Marco Antonio de
Souza Brito. -- São Paulo, 2018.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas.

Orientador: Francisco Garcia Soriano.

Descritores: 1.Sepse 2.Estresse oxidativo
3.Lipopolissacarídeos 4.Espécies reativas de
oxigênio 5.Equilíbrio redox 6.Unidades de terapia
intensiva

USP/FM/DBD-416/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Dedico este trabalho a minha avó, *in memoriam*, o amor da minha vida, e não existirá ninguém que me amou tanto quanto ela. Esteve sempre comigo, desde a matrícula na pré- escola até a pós-graduação, e eu estive com ela até o último suspiro. Está muito feliz no céu e eu sei que está sempre comigo me segurando e assegurando de que tudo ficará sempre bem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu o dom da vida e me abençoa todos os dias com o seu amor infinito.

A minha mãe Selma e minha irmã Larissa, por todo apoio em todos os momentos difíceis, os meus mais sinceros agradecimentos por me ajudar a enfrentar a vida.

Ao meu orientador Dr. Francisco Soriano, pela gentileza e dedicação durante a orientação. Um exemplo de profissional a ser seguido, os meus mais sinceros agradecimentos pela disponibilidade.

A Dra. Denise Frediani e ao Dr. Hermes Barbeiro, eles que estiveram comigo em todos os experimentos durante todo esse período como mestrando, me ajudando, aconselhando, ensinando e sendo amigos. São pessoas que eu quero levar para o resto da vida. À vocês minha eterna gratidão.

Aos professores presentes na banca, pela disponibilidade e idéias que com certeza enriqueceram muito este trabalho.

Aos meus amigos da Clínica Médica da Faculdade de Medicina: Kelli, Brendha Cação, Fátima Abatepaulo, Dr. Marcia Koike, Sueli Aribo, Dra. Thaís Martins, Dr. Ricardo Petrônio, Ms. Rosângela Pimentel, Ms. Mariana Serra, Geraldo Sobrinho, Marta e Dra. Tatiane Corrêa.

A minha noiva Aline Bisso, pela paciência e apoio dispensado nos momentos que eu mais precisei durante este período.

Aos meus irmãos Waldemar e Natália, melhores amigos e sei que poderei contar com eles para o resto da vida.

A todos os meus amigos que a vida me presenteou, eles, que estão comemorando cada etapa dessa jornada comigo, não citarei nomes pois não caberia nas páginas deste agradecimento.

A CAPES pelo apoio financeiro indispensável para a realização deste projeto de mestrado.

Não sei o que parece aos olhos do mundo, mas aos meus pareço apenas ter sido como um menino brincando à beira-mar, divertindo-me com o fato de encontrar de vez em quando uma pedra mais lisa ou uma concha mais bonita que o normal, enquanto o grande oceano da verdade permanece completamente misterioso diante dos meus olhos.

Isaac Newton

Sumário

1. 0 Introdução	01
1.1 Sepses – Fundamento da importância do seu estudo.....	1
1.2 Fisiopatologia da sepsis.....	3
1.3 Reconhecimento pelos receptores imunológicos e sinalização intracelular e extracelular.....	5
1.4 Papel das espécies reativas de oxigênio (EROs) e das espécies reativas de nitrogênio (ERN) na sepsis.....	9
1.5 Óxido nítrico – Importante molécula sinalizadora e participante do sistema imunológico.....	11
1.6 Estresse oxidativo – O desequilíbrio do sistema redox e os danos celulares	12
1.7 Marcadores do estresse oxidativo.....	15
1.8 Mitocôndrias: Características da organela e a importância da biogênese mitocondrial.....	17
1.9 Tolerância ao lipopolissacarídeo (LPS) – O mecanismo evolutivo de resistência do hospedeiro à infecção e autolesão.....	18
1.10 Alterações hepáticas na sepsis.....	19
2.0 Objetivos	20
2.0 Objetivos gerais.....	20
2.1 Objetivos específicos.....	20

3.0 Materiais e métodos	21
3.1 Modelo biológico.....	21
3.2 Constituição dos grupos.....	22
3.3 Anestesia.....	23
3.4 Tolerância.....	23
3.5 Ligadura e punção cecal.....	24
3.6 Pulverização dos órgãos captados.....	24
3.7 Extração de mRNA.....	25
3.8 Quantificação da substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARs).....	25
3.9 Determinação da atividade enzimática de Superóxido Dismutase.....	26
3.10 Determinação da atividade enzimática de Catalase.....	27
3.11 Determinação da atividade enzimática de Glutathione Redutase	27
3.12 Quantificação de nitrito.....	28
3.13 Análise estatística.....	29
 4.0 Resultados	 30
4.1 Peso dos animais.....	30
4.2 Quantificação do biomarcador malondialdeído (MDA), após reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARs).....	31
4.3 Quantificação de nitrito no tecido hepático.....	32
4.4 Quantificação de DNA mitocondrial no tecido hepático.....	33

4.5 Quantificação de RNA mensageiro do gene da superóxido dismutase no tecido hepático.....	34
4.6 Quantificação da proteína Superóxido dismutase no tecido hepático.....	35
4.7 Quantificação de RNA mensageiro do gene da Glutathione redutase no tecido hepático.....	36
4.8 Quantificação de RNA mensageiro do gene da Glutathione peroxidase no tecido hepático.....	37
4.9 Quantificação da proteína Glutathione redutase no tecido hepático.....	38
4.10 Quantificação de RNA mensageiro do gene da Catalase no tecido hepático.....	39
4.11 Quantificação da proteína Catalase no tecido hepático.....	40
 Discussão	41
 Conclusão	47
 Bibliografia	48

Lista de abreviaturas e siglas

SIRS – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica.

SOFA – Sequential organ failure assessment.

UTI – Unidade de terapia intensiva.

EROS – Espécie reativa de oxigênio.

NO – Óxido nítrico.

PAF – Fator ativador de plaquetas.

LPS – Lipopolissacarídeo.

PAMPS – Padrões moleculares associados a patógenos.

DAMPS - Padrões moleculares associados a danos.

TLR – Toll like receptors.

DCs – Células dendríticas.

ERN – Espécie reativas de nitrogênio.

SOD – Superóxido dismutase.

CAT – Catalase

GPX – Glutathione peroxidase.

MDA- Malondialdeído

Tbars – Ácido tiobarbitúrico.

CLP – Ligadura e punção cecal

CLPT – Animais tolerantes submetidos a ligadura e punção cecal.

TOL – Animais tolerante

CTL - Animais controle

Lista de figuras

Figura 1. A estrutura do receptor Toll- Like humano (TLR).....	6
Figura 2. Sinalização dependente da molécula adaptadora MyD88.....	7
Figura 3. Visão geral das vias de sinalização dos receptores Toll- Like.....	9
Figura 4. Redução tetraivalente do oxigênio molecular (O ₂) na mitocôndria.....	11
Figura 5. Geração das Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) e das enzimas antioxidantes.....	14
Figura 6. A formação do malondialdeído (MDA).....	17
Figura 7. Organização celular e suas atividades no fígado.....	21
Figura 8. Modelo cirúrgico de ligadura e punção cecal.....	24
Figura 9. Curva de sobrevivência de animais controles e tolerantes.....	30
Figura 10. Quantificação do marcador malondialdeído (MDA) após reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), análise realizada no fígado extraído 4 , 8 e 12 horas após a ligadura e punção cecal.....	31
Figura 11. Quantificação de nitrito, análise realizada no fígado extraído 4, 8 e 12 horas após a ligadura e punção cecal.....	32
Figura 12. Quantificação de DNA do gene da mitocôndria, análise realizada no fígado extraído 4, 8 e 12 horas após a ligadura e punção cecal.....	33
Figura 13. Quantificação de RNA mensageiro do gene da Superóxido dismutase (SOD) na tolerância, análise realizada no fígado extraído 4, 8 e 12 horas após a ligadura e punção cecal.....	34
Figura 14. Quantificação da atividade proteica da Superóxido dismutase (SOD) na tolerância, análise realizada no fígado extraído 4, 8 e 12 horas após a ligadura e punção cecal.....	35
Figura 15. Quantificação de RNA mensageiro do gene da Glutathione redutase na tolerância, análise realizada no fígado extraído 4, 8 e 12 horas após a ligadura e punção cecal.....	36

Figura 16. Quantificação de RNA mensageiro do gene da glutathione peroxidase na tolerância, análise realizada no fígado extraído 4, 8 e 12 horas após a ligadura e punção cecal.....	37
Figura 17. Quantificação da proteína Glutathione redutase, análise realizada no fígado extraído 4, 8 e 12 horas após ligadura e punção cecal.....	38
Figura 18. Quantificação de RNA mensageiro do gene da Catalase na tolerância, análise realizada no fígado extraído 4, 8 e 12 horas após a ligadura e punção cecal.....	39
Figura 19. Quantificação da proteína Catalase, análise realizada no fígado extraído 4, 8 e 12 após ligadura e punção cecal.....	40

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Relação do foco infeccioso inicial e a taxa de mortalidade causados pelos mesmos	2
--	----------

[Digite aqui]

Resumo

Brito MAS. *Estudo do estado oxidante e antioxidante na sepse de origem peritoneal em animais submetidos a tolerância pelo lipopolissacarídeo* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

O fenômeno da tolerância ao lipopolissacarídeo ocorre quando animais expostos a pequenas doses de LPS tornam-se hiporresponsivos a doses letais posteriores. Tendo em vista que a capacidade do hospedeiro de tolerar a presença de agentes patogênicos é uma estratégia do organismo humano e que reduz o impacto negativo durante a sepse, o objetivo do estudo foi investigar se a tolerância ao lipopolissacarídeo resulta em efeitos benéficos na atividade das enzimas antioxidantes e investigar possíveis diminuição da peroxidação lipídica, durante o estresse oxidativo. Após verificarmos a atividade das enzimas antioxidantes concluímos que tolerância ao lipopolissacarídeo tem um papel importante no equilíbrio redox, onde houve aumento da expressão de superóxido dismutase (SOD), nos animais tolerantes submetidos a ligadura e punção cecal, defendendo o hospedeiro de forma que o mesmo não respondesse de forma exacerbada nas exposições subsequentes a produtos de microrganismos patogênicos.

Descritores: sepse; estresse oxidativo; lipopolissacarídeos; espécies reativas de oxigênio; equilíbrio redox; unidades de terapia intensiva.

[Digite aqui]

Abstract

Brito MAS. *Oxidative and antioxidant status in peritoneal sepsis in animals submitted to lipopolysaccharide tolerance* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Sepsis has recently been classified as a fatal organic dysfunction caused by dysregulation of the immune response to a particular infection. It is a serious condition that can cause failure of one or multiple organs. It represents the main cause of death in patients treated in an intensive care unit (ICU). Most registered cases of sepsis are due to gram-negative bacteria. Lipopolysaccharide (LPS), a component of the outer membrane of the bacterium, triggers a cascade of activities of the immune system. This response to LPS produces several inflammatory mediators and can generate oxidative stress also known as redox imbalance through the release of reactive oxygen species (EROS). Considering that the host's ability to tolerate the presence of pathogens is a strategy of the human organism and reduces the negative impact of the disease, we propose to investigate whether endotoxemia results in beneficial changes, maintaining the redox balance during the sepsis period. After verifying the relative mRNA expression and protein quantification, we conclude that endotoxemia caused by lipopolysaccharide plays an important role in the immunoregulation of the inflammatory response defending the host so that it does not respond exacerbatedly in subsequent exposures to products of pathogenic microorganisms.

Descriptors: sepsis; oxidative stress; lipopolysaccharides; reactive oxygen species; redox balance; intensive care units.

1.0 Introdução

1.1 Sepses – Fundamento da importância do seu estudo.

Em 1992 pesquisadores realizaram uma conferência da Sociedade de Terapia Intensiva Americana, e estabeleceram a doença como um subgrupo da síndrome da resposta inflamatória sistêmica. (Bone, Roger C; et al, 1992) A síndrome da resposta inflamatória sistêmica foi caracterizada pela presença de dois ou mais sintomas, conforme descritos a seguir: a) temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ ou $<36^{\circ}\text{C}$; b) frequência cardíaca >90 bpm; c) frequência respiratória acima de 20 rpm ou $\text{PaCO}_2 < 32$ torr e contagem de leucócitos acima $12000/\text{mm}^3$ ou $<4000/\text{mm}^3$ (Abraham, E; et al, 2000). Em 2001, houve um segundo encontro científico, onde discutiram definições de sepsis e os critérios diagnósticos. Neste consenso, definiram a sepsis 2, organizando os critérios para melhorias no diagnóstico clínico. (Levy, Mitchell M; et al, 2003).

Mais recentemente a Sociedade Europeia de Medicina Intensiva (ESICM), publicou novas definições para Sepsis 3. (Donnelly JP; et al, 2017). Onde, o diagnóstico clínico está sendo baseado pela análise criteriosa de dois ou mais pontos no escore Sequential Organ Failure Assessment (SOFA). (Ca, Aakre; et al, 2017; R, Martischang; et al, 2018; A, Leligdowicz; et al, 2014; S, Tusgul; et al, 2017). Aproximadamente 20% dos pacientes internados em unidade de terapia intensiva desenvolve sepsis moderada, 35% a 45% sepsis severa e cerca de 60% choque séptico. (M, Levy; et al, 2003). Estima-se que anualmente no mundo 30 milhões de

pessoas desenvolvem sepse, 19 milhões desenvolvem o choque séptico e 6 milhões evoluem ao óbito, e essa estimativa vem crescendo nas últimas décadas. (F, Alhamshem; *et al*, 2017; SN, Stehr; *et al*, 2013; A, Peters; *et al*, 2018; M, Tolonen; *et al*, 2018; K, Anja; *et al*, 2015; Z, Ricci; *et al*, 2011).

Gráfico 1 : Órgãos com maiores índices de infecção primária e taxa de mortalidade causada pelos mesmos. Adaptado de: Alhashem F; *et al*, 2017.

O grupo de risco geralmente é integrado principalmente por crianças menores de 2 anos ou idosos acima de 55 anos, obesos, diabéticos, transplantados, pacientes que estão em tratamento de quimioterapia ou radioterapia, transfusão sanguínea, portadores de HIV, entre outras moléstias. (D, Tang; *et al*, 2012; A, Kasza; *et al*, 2013; P, Nasa; *et al*, 2012). A infecção comumente inicia-se em um órgão primário, frente a desordem do sistema imunológico, essa infecção não erradicada acomete outros sistemas como: metabólico, nervosos, respiratório, cardiovascular, renal, hepático. (D,F Gaieski; *et al*, 2013; B, Casserly; *et al*, 2015; R, Sato; *et al*, 2015, Z, Ricci; *et al*, 2011). Subsequente a esses fatores há um aumento nos níveis de lactato, hipotensão arterial. Frente a resposta exacerbada do hospedeiro, pode ocorrer o choque hemodinâmico, que evolui para óbito em 35% desses pacientes, segundo o ILAS. (C, Fleischmann; *et al*, 2016; E, Finkelsztejn; *et al*, 2017; R, Hirschy; *et al*, 2018; DF, Gaieski; *et al*, 2013).

1.2 Fisiopatologia da sepse.

A sepse pode ser causada por diversos microrganismos que são capazes de invadir diversos órgãos dos seres vivos. A patologia é reconhecida por envolver a ativação simultânea e precoce das respostas pró e anti-inflamatórias, além de modificações expressivas nas vias não-imunológicas (Donnelly JP; *et al*, 2017). A resposta imune é caracterizada pela sucessão dos mecanismos inatos e adaptativos, ou seja, nas fases iniciais da infecção há um predomínio das respostas inatas e nas

fases mais tardias os linfócitos passam a gerar respostas imunes adaptativas. A principal diferença entre estes dois tipos de resposta é que a resposta imune adaptativa é altamente específica e dispõe de memória, facilitando a ação das células em exposições subsequentes aos mesmos microrganismos. Por outro lado, os mecanismos efetores da imunidade inata (peptídeos antimicrobianos, fagócitos e via alternativa do complemento) são ativados imediatamente depois da invasão, essa resposta utiliza sistemas de reconhecimento primitivos e inespecíficos, que permitem sua ligação a muitos produtos microbianos. Como citado acima a primeira linha de defesa do hospedeiro é realizada pela imunidade inata, após o contato com o agente patogênico inicia-se uma rápida reação inflamatória mediada principalmente por monócitos e neutrófilos em prol da erradicação do mesmo (P, Nasa; *et al*, 2012). Todo o processo de defesa se inicia após reconhecimento dos PAMPS (padrão molecular associado a patógeno) e ou DAMPS (padrão molecular associado a dano), além de diversos receptores intra e extra-celulares. (L, Xin Gen; *et al*, 2016). Esta grande diversidade de receptores pertencentes ao sistema imunológico tem uma função importante no reconhecimento das estruturas de diversos agentes patogênicos: bactérias, vírus, fungos, não somente estes, mas também, produtos de danos teciduais como: traumas e queimaduras. Após a interação celular com o microrganismo ocorre a ativação da cascata de sinalização intracelular, fosforilando proteínas e subsequente a isto ocorre ativação de múltiplos genes, produzindo diversas citocinas. Após este estímulo há liberação de múltiplos mediadores inflamatórios importantes. Para haver manutenção da homeostase do sistema imune,

também se faz necessária a ação das citocinas anti-inflamatórias. A inflamação sistêmica causa lesões e alterações distantes do foco inicial causando: vasodilatação disseminada, depressão miocárdica, perda da perfusão adequada, coagulação intravascular disseminada e lesão isquêmica de múltiplos órgãos. (DF, Gaieski; *et al*, 2013; P, Nasa; *et al*, 2012).

1.3 Reconhecimento pelos receptores imunológicos e sinalização intracelular e extracelular.

O mecanismo de reconhecimento específico da imunidade inata é deflagrado por receptores de membrana celular, que, são ativados por moléculas comuns a diversos agentes patogênicos que têm sido designados na literatura como PAMPS (*“Pathogen- associated molecular patterns”* – Padrões moleculares associado ao patógeno) (MJ, Delano; *et al*, 2016). Entre estes padrões, são conhecidos o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram negativa, o ácido lipotecóico presente na membrana das bactérias gram positivas, peptideoglicanos, fragmento de DNA bacteriano, fragmento de DNA e/ou RNA viral, flagelina, zimosan, taxol, etc (M, Shannon; *et al*, 2018; O, Takeuchi; *et al*, 2010). Além dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP), é sabido que o sistema imunológico do hospedeiro reconhece os DAMPS (*Danger- associated molecular patterns*- padrão molecular associado a danos), liberado por células mortas após sofrerem lesão

celular. (M, Shannon; *et al*, 2018; O, Takeuchi; *et al*, 2010; SM, Wallet; *et al*, 2018; MK, Vidya; *et al*, 2018).

Figura 1. A estrutura do receptor *Toll-like* humano (TLR). TLRs humanos são proteínas transmembrânicas do tipo I, com um domínio de repetição extracelular rico em leucina (LRR) e um citoplasmático, referindo como domínio do receptor Toll/ IL-1 (TIR), que homólogo ao do receptor da IL-1. (Adaptado de Sandor e Buc, 2005).

Os receptores *Toll-like*, são proteínas transmembrânicas expressas em inúmeras células do sistema imune, tais como macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, mastócitos, células dendríticas (DCs), Células Natural Killers (NK) e em muitos outros tipos celulares incluindo ECs, adipócitos, miócitos e plaquetas (T, Kawai; *et al*, 2010; EM Reuven; *et al*, 2014). TLR é capaz de ativar vias de sinalização

distintas que envolvem diferentes cofatores e moléculas adaptadoras intermediando diversas respostas imunes (**Figura 1**).

Uma das vias de sinalização é a de MyD88 (**Figura 2**) que é ativada pela ligação direta do domínio TIR citoplasmático com a proteína adaptadora contendo o domínio TIR (TIRAP), que recruta a molécula adaptadora MyD88 e de quinases associadas ao receptor IL-1 (IRAK). Após a auto fosforilação das IRAK, a proteína adaptadora associada ao receptor de TNF (TRAF6) interage com complexos de proteínas, ativando o complexo I κ B-quinase (IKK) e por fim, ativando o fator transcrição nuclear kappa B (NF- κ B). (H, Hug; *et al*, 2018; SC, Lin; *et al*, 2010).

Figura 2 – Sinalização dependente da molécula adaptadora MyD88. A ativação de TLR4, atuará na sinalização via MyD88 e IRAK4, e na ativação do complexo IKK, formado pelo complexo NEMO, IKK- α e IKK – β . O complexo IKK fosforila I κ B, o inibidor do fator nuclear κ B (NF κ B), levando a sua ubiquitinação e degradação. Isto

libera o NFkB para ser translocado para o núcleo e induz a expressão de genes codificadores de citocinas inflamatória. Adaptado de Jyonouchi; et al, 2013).

Há outra via de sinalização, a “via de sinalização independente de MyD88” que envolve a proteína adaptadora contendo o domínio TIR indutora de Interferon β (TRIF) ou a molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM), que levam à fosforilação do fator 3 de regulação do Interferon (IRF3), induzindo a produção de interferon do tipo I e moléculas co-estimulatórias. (Kawai, T; et al, 2006, O'Neill, L.A; et al 2007).

Figura 3. Visão geral das vias de sinalização do receptor Toll-like. LPS entregue pelo CD14 ao TLR4/MD2 inicia uma cascata de sinalização através do domínio TIR e das moléculas adaptadoras MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM, que podem ativar algum dos fatores de transcrição NFkB, IRF5, AP1 e/ou IRF3. AP1, proteína ativadora 1; Ikb, inibidor do fator nuclear kB; IKK α , quinase α do Ikb; IKK β , quinase β do Ikb; IKK γ , quinase γ do Ikb; IRAK1, quinase 1 associada ao receptor de IL-1; IRAK4, quinase 4 associada ao receptor de IL1; IRF3, fator 3 regulatório do interferon; IRF5, fator 5 regulatório do interferon; JNK, quinase c-jun N-terminal; LPS, lipopolissacarídeo; MyD88, proteína de resposta primária a diferenciação mielóide; NFkB, fator nuclear kB; RIP1, proteína 1 de interação com o receptor; TAB1, proteína 1 de ligação à TAK-1; TAB2-3, proteínas 2 e 3 de ligação à TAK-1; TAK1 (M3K7), quinase 1 ativada pelo fator de crescimento e transformação β ; TBK1, proteína serina-treonina quinase; TIRAP, proteína adaptadora contendo domínio TIR; TLR4, receptor Toll-like 4; TRAF6, fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral; TRAM, molécula adaptadora relacionada à TRIF; TRIF, adaptador contendo domínio TIR indutor de interferon β ; Ub, ubiquitina; UB2V1, variante 1 da enzima E2 conjugada a ubiquitina; UBE2N, enzima E2N conjugada à ubiquitina. Adaptado de Frantz et al., 2007.

1.4 Papel das espécies reativas de oxigênio (EROS) e das espécies reativa de nitrogênio (ERN) na sepse.

Os radicais livres são moléculas, átomos ou íons que apresentam um elétron desemparelhado, sendo reativo e instável, onde tende a se ligar a outro elétron para alcançar a estabilidade. Neste caso focaremos nas “Espécies Reativas de Oxigênio”, onde pequenas frações de oxigênio (2 a 5%) são reduzidas univalentemente, dando início à formação das EROS (**Figura 4**). As Espécies reativas são definidas como moléculas orgânicas, inorgânicas e átomos os quais possuem um ou mais elétrons não pareados, com capacidade de existência independente. (Y, Ren; *et al*, 2018; J, Egea; *et al*, 2017).

Duas considerações importantes: 1) - radical livre não é o termo ideal para designar todas as espécies reativas. O ânion-radical superóxido (superóxido ou O_2^-) e o radical hidroxila (OH), são radicais livres porque apresentam elétron não-pareado na sua última camada, por outro lado outras espécies, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada - daí a preferência pela nomenclatura genérica Espécies Reativas de Oxigênio (EROS). 2) - Espécies reativas de oxigênio (EROS ou do ing. ROS) são importantes para controlar invasão dos patógenos oportunistas além de serem importantes moléculas de sinalização, mas podem gerar lesões em órgãos distantes do foco inicial, quando produzidas em grande quantidade. (Y, Ren; *et al*, 2018). Quando o elétron desemparelhado se encontra centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são

denominados espécies reativas do oxigênio (EROs) ou espécies reativas do nitrogênio (ERNs), respectivamente.

Figura 4 – Redução tetraivalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação da água (H_2O). Várias espécies reativas de oxigênio são formadas no processo. Adaptado de Cohen, 1989.

1.5 Óxido nítrico – Importante molécula sinalizadora e participante do sistema imunológico.

O óxido nítrico é radical livre, uma molécula gasosa que tem diversas funções em todo o sistema, agindo como importante vasodilatador, participando ativamente do processo da agregação plaquetária, tem papel importante na resposta imunológica, pois, quando as células são estimuladas, liberam uma grande porção de NO, que por sua vez atuará de forma efetiva destruindo bactérias, parasitas, células cancerosas. É endogenamente biosintetizado por praticamente todas as células do sistema imunológico, a sua síntese ocorre através da INOS (isoforma indutível), que produz óxido nítrico a partir da L-arginina (DN, Granger; *et al*, 2015). O NO é uma molécula com importante função de sinalização, podendo ativar a via guanilato ciclase e ser convertido em muitos outros derivados mais reativos, conhecidos coletivamente como Espécie Reativas de Nitrogênio (ERN). Em altas concentrações, NO reage diretamente com oxigênio para formar dióxido de nitrogênio NO₂, que velozmente reage com outra molécula de óxido nítrico, formando o anidrido nitroso N₂O₃. Ao ser liberado do espaço intracelular o óxido nítrico rapidamente agirá no interior dos microrganismo, e após difundir-se podem danificar atacando os centros de ferro e enxofre de várias proteínas chaves, prejudicando tanto o ciclo respiratório como a síntese de DNA, causando sua morte.

1.6 Estresse oxidativo – O desequilíbrio do sistema redox e os danos celulares.

As espécies reativas de oxigênio podem ser geradas através de três diferentes fontes: ativação da NAD(P)H oxidase, Xantina Oxidase ou pela via da respiração mitocondrial (Figura 5), porém a sua produção exacerbada pode culminar em importante lesão celular (DN, Granger; *et al*, 2015). O estresse oxidativo começou a ser melhor entendido em meados dos anos 80. Este processo ocorre quando há desequilíbrio entre os mecanismos pró-oxidantes e anti-oxidantes (G, Donald; *et al*, 2011; S, Helmut; *et al*, 2015).

Figura 5. Geração das Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) e das enzimas antioxidantes. O radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é gerado por diferentes fontes: ativação da NAD(P)H, Xantina oxidase ou através da mitocôndria. Quando produzida em excesso são reduzidas pelas enzimas antioxidantes, afim de manter a homeostase e o equilíbrio redox. (Adaptado P, Poprac et al; 2017)

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir ou reduzir diversos danos causados pela ação exacerbada dos radicais livres, é subdividido em enzimático e não enzimático, cada um tem diferentes mecanismos de ação, mas ambas trabalham incessantemente para impedir a formação dos radicais livres em excesso. A iniciar pelos antioxidantes enzimáticos, fazem parte desse grupo:

1. superóxido dismutase (SOD), enzima encarregada em reduzir o superóxido em peróxido de hidrogênio. Esta enzima é subdivida em três grupos: Fe-SOD, SOD-Cu/Zn (Citoplasma), SOD-Mn (Mitocôndria) (K, Nakamura; *et al*, 1988; X, Lu; *et al*, 2015; H, Liu; *et al*, 2015; NG, Robinett; *et al*, 2018).

2. Catalase (CAT), heme-enzima localizada predominantemente em peroxissomo, onde catalisa a decomposição de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (AJ, Pratt; *et al*, 2015; HT, Sepasi; *et al*, 2018; C, Glorieux; *et al*, 2017).

3. A glutathione peroxidase (GPx) é dependente de selênio e catalisa a redução de peróxido de hidrogênio em água ou álcool, é necessário a ação da glutathione reduzida para formar a glutathione oxidada. A atividade da GPx encontra-se dois terços no citoplasma e um terço na mitocôndria. (C, Glorieux; *et al*, 2015).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes em favor das oxidantes, resultando em diversos danos celulares (BL, Kedrowski; *et al*, 2013; ED, Kantor; *et al*, 2013; B, Poljsak, *et al*, 2013,

A, Chandrasekaran; *et al*, 2017). Existe outro sistema de defesa antioxidante e pertencente ao grupo não-enzimático, que compreende os compostos de origem dietética, como o ácido ascórbico (Vitamina C), e precursores das vitaminas A e E.

Os danos celulares são resultantes da elevação na produção de EROS/ERN que por sua vez reagem com biomoléculas como: carboidratos, DNA, lipídeos e proteínas. Estes danos excessivos levam a uma disfunção celular devido a um comprometimento do genoma, organelas e permeabilidade das membranas, dentre elas a mitocondrial e favorecendo a liberação de fatores pró apoptóticos. (BL, Kedrowski; *et al*, 2014; B, Poljsak; *et al*, 2013; A, Chandrasekaran; *et al*, 2017).

1.7 Marcadores do estresse oxidativo.

Quando a produção de radicais livres, espécies reativas de oxigênio (EROS) e/ou espécies reativas de nitrogênio (ERN), supera a força da ação dos antioxidantes, inicia-se rapidamente a oxidação de biomoléculas. Nesse processo há formação de diversos componentes específicos, denominados biomarcadores do estresse oxidativo. (C, Yzydorczyk; *et al*, 2015). Neste trabalho, focaremos no malondialdeído.

Malondialdeído - É formado a partir da peroxidação lipídica, ou seja, a sua disposição inicia-se durante a degradação lipídica da membrana celular (L, Leonardo; *et al*, 2013; WL, Scott; *et al*, 2014). O ácido araquidônico (AA), é liberado devido a ação das fosfolipases PLA₂, então é atacado pelas espécies reativas de oxigênio (EROS), principalmente pelo radical hidroxila OH, dessa forma este “endoperóxido” sofre uma

quebra espontânea, começando a formação do Malondialdeído no espaço intracelular. (C, Yzydorczyk; *et al*, 2015). Após a formação no espaço intracelular, este biomarcador é liberado na corrente sanguínea podendo ser detectado até 30 dias após a sua formação, sendo muito importante para diagnóstico clínico de pacientes (C, Yzydorczyk; *et al*, 2015). **(Figura 6)**

Figura 6: Formação do malondialdeído: Após a ruptura lipídica causada por PLA2, há liberação do ácido araquidônico, as Espécies Reativas de Oxigênio (EROS), por sua vez agem neste ácido. Então o lipídeo endoperóxido, tem uma ruptura espontânea formando o Malondialdeído. (Adaptado de: Leonado Lorente *et al*; 2013; C, Yzydorczyk; *et al*, 2015).

1.8 Mitocôndrias: Característica e importância da organela no estresse oxidativo.

A Mitocôndria é uma organela com diversas atividades importantes: faz a respiração aeróbia, participa da sinalização com outras organelas, impactando em diferentes respostas como a divisão, diferenciação e até a morte celular programada. (J, Duran-Bedolla; *et al*, 2015). Durante a sepse pode ser gerada uma grande quantidade de espécies reativas, que causam diversas modificações negativas nas organelas celulares, dentre essas lesões há grave disfunção mitocondrial (I, Lee; *et al*, 2014). Esta organela é responsável por aproximadamente 90% da energia do corpo na forma de ATP, a sua desregulação é um fator crítico para a disfunção múltipla dos órgãos (J, Duran-Bedolla; *et al*, 2015). A densidade mitocondrial na célula é regulada pela biogênese, uma resposta dependente de fatores fisiológicos e patológicos que permitem interação entre os genomas nucleares e mitocondriais. Pesquisadores recentemente apontaram que doses não letais de lipopolissacarídeo (LPS) induzem marcadores de biogênese mitocondrial em cardiomiócitos e células não neuronais, entretanto, indicaram que o LPS tem efeito positivo, onde parece aumentar o conteúdo mitocondrial e melhoria no desempenho de sua função frente a um quadro infeccioso (I, Lee; *et al*, 2014).

1.9 Tolerância ao lipopolissacarídeo (LPS)- O mecanismo evolutivo de resistência do hospedeiro à infecção e autolesão.

A resistência ao lipopolissacarídeo pode ser determinada geneticamente ou adquirida. Animais de experimentação submetidos a exposição prévia a doses sub-letais de lipopolissacarídeo podem apresentar um estado de resistência adquirida e tornar estes animais resistentes a doses letais, pirogênicas e metabólicas de LPS. O fenômeno da interrupção da mortalidade associada ao LPS, ou então chamado como tolerância a endotoxina, não é específico à ação do lipopolissacarídeo e apresenta reação cruzada com outros estímulos, tais como, peptidoglicano, lipoproteína das bactérias, lipoarabinomanana, estresse hipertérmico, ácido lipoteicoico, muramíl dipeptídeo de micobactéria, 25-hidroxi-colesterol, estresse cirúrgico, isquemia, TNF e IL-10 (P, Invernizzi; *et al*, 2013). As fases iniciais e tardias da tolerância com características diferentes seguem a injeção inicial do LPS. A fase inicial pode ser detectada dentro das primeiras 24 horas após a exposição ao lipopolissacarídeo e pode durar até oito dias. A tolerância ao LPS relaciona-se à produção e liberação reduzidas de citocinas pelos fagócitos em re-exposição ao LPS. Além disso, foi demonstrado que a exposição prévia ao lipopolissacarídeo resulta em alteração de padrão de expressão gênica de citocinas (EC, Rios; *et al*, 2016; TM, de Lima; *et al*, 2014; SK, Ariga; *et al*, 2014; ES, Melo; *et al*, 2010). Parece que a tolerância a endotoxina resulta de alterações em rotas de transdução de sinal induzidas pelo LPS. Dentre os múltiplos mecanismos que controlam a extensão e duração da inflamação

induzida pela sinalização através dos receptores Toll-like (TLR), encontram-se a inibição destes receptores por reguladores negativos, a produção de citocinas anti-inflamatórias e alterações da sinalização TLR. Estes eventos estão diretamente ligados ao fenômeno da tolerância (Foster, S.L; et al, 2007). Esta adaptação da resposta imune inata está relacionada aos mecanismos epigenéticos, ou seja, a regulação específica não é devida ao mecanismo de sinal específico e sim é gene-específica através de modificações na cromatina (Foster, S.L; et al, 2007).

1.10 Alterações hepáticas na sepse.

O corpo humano é dotado de diversos sistemas que em normal funcionamento são responsáveis por manter a vida dos seres vivos. Há diversos tecidos, cada um com sua estrutura e funcionalidade particular ou até mesmo comunicando entre si, para que se possível mantenham a homeostase do sistema. Neste trabalho optamos por estudar o fígado, um importante órgão do sistema digestório, com alta capacidade de regeneração e possuindo diversas funções importantes no organismo, esse tecido funciona como “filtro” de microrganismos advindos do intestino via sistema porta. Uma das funções hepáticas é proteger o hospedeiro de diversos tipos de patógenos. (M, Bauer; et al, 2013; P, Dimitrios; et al, 2013). O fígado é responsável pela produção de mediadores inflamatórios de fase aguda, além de ter participação dos hepatócitos, células endoteliais sinusoidais (SECs) e as células de Kupffer (KCs) (P, Dimitrios; et al, 2013).

Entretanto, quando há um quadro de sepse o fígado pode ser afetado por patógenos, toxinas e mediadores inflamatórios e estas injúrias irreversíveis progressivamente culminam na falência desse órgão. Contudo, considerando a importância desse órgão para a defesa do hospedeiro e manutenção da sua homeostase, optamos por estudar o funcionamento deste tecido mediante a tolerância ao lipopolissacarídeo, afim de verificar se houve maior resistência no tecido em relação ao controle. (MA, Khan; *et al*, 2017; J, Yan; *et al*, 2014; M, Bauer; *et al*, 2013; Dimitrios, P; *et al*, 2013; DG, Doherty; *et al*, 2016).

Figura 7: Organização celular no fígado: As células de defesa do fígado, estão prontamente organizadas para combater o agente infeccioso.

2. Objetivos gerais

- Avaliar se a indução de tolerância por múltiplas doses de lipopolissacarídeo altera a capacidade antioxidante nos animais.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a taxa de sobrevivência de animais.
- Avaliar a atividade da enzima Glutathione redutase no fígado dos animais.
- Avaliar a atividade da enzima Catalase no fígado dos animais.
- Avaliar a quantidade de peroxidação lipídica no fígado dos animais.
- Avaliar a expressão gênica nos animais.
- Avaliar a quantidade de DNA mitocondrial no fígado dos animais.
- Avaliar a quantidade de nitrito no fígado dos animais.

3.0 Materiais e métodos.

3.1 Modelo biológico.

Foram selecionados camundongos machos Balb-C, pesando entre 20-25 gramas provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os camundongos ficaram mantidos em gaiolas por pelo menos sete dias, em local com temperatura e ciclo de luz controlado, recebendo água e comida *ad libitum*, permanecendo durante o experimento no Biotério de Manutenção do LIM 17 Disciplina de Reumatologia, sob responsabilidade do biólogo Antônio dos Santos Filho.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo The Universities Federation for Animals Welfare (UFAW). Nosso projeto recebeu aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq).

3.2 Constituição dos grupos.

Cada grupo foi constituído por 10 animais. Todos os animais foram mantidos em gaiolas com água e alimentação *ad libitum* até o momento do procedimento.

Grupo Controle

Foram sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos foram coletados e mantidos em refrigeração de -80°C.

Grupo ligadura e punção cecal

Animais submetidos a ligadura e perfuração do ceco retornaram às gaiolas com água e alimentação e após 4,8 e 12 horas foram sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos coletados e mantidos em refrigeração a -80°C.

Grupo tolerante

Administrada a injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (de *Escherichia coli* - Serotype 026: B6/Sigma) na dose de 1 mg/kg por 5 dias. No oitavo dia foram sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos coletados e mantidos em refrigeração a -80 °C.

Grupo Tolerante com Ligadura e perfuração do ceco

Administrada a injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (de *Escherichia coli* - Serotype 026: B6/Sigma) na dose de 1 mg/kg por 5 dias. No oitavo dia foram submetidos a ligadura e perfuração do ceco. Retornaram a gaiola com água e alimentação ad libitum e nos períodos de 4,8 e 12 horas, foram sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos coletados e mantidos em refrigeração à -80 °C.

3.3 Anestesia.

Para que houvesse o procedimento de ligadura e perfuração do ceco (CLP), os animais foram pesados e anestesiados com a associação de Ketamina (80mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg), administrada por via intraperitoneal.

3.4 Tolerância.

Os animais foram pesados e submetidos à exposição de pequenas doses de lipopolissacarídeo (*Escherichia coli* - Serotype 026: B6/Sigma). 1 mg/kg por 5 dias.

3.5 Ligadura e punção cecal (CLP).

Os camundongos foram previamente anestesiados com uma associação de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), administrada por via intraperitoneal. Sob condições assépticas, realizamos uma laparotomia mediana de 3 cm para permitir a exposição do ceco e áreas adjacentes. O ceco foi submetido à ligadura com fio de algodão 1,5 em sua base, abaixo da válvula ileocecal, e perfurado três vezes com uma agulha calibre 22, com uma distância de 1 cm. O ceco foi cuidadosamente comprimido para provocar a saída de uma pequena quantidade de fezes pelos locais perfurados, e devolvidos à cavidade peritoneal. Após a realização da laparotomia mediana, realizamos a sutura com fio de seda 4.0. **(Figura 8).**

Figura 8: Procedimento de ligadura e punção cecal (CLP) de animais submetidos a sepse experimental. (A) O animal foi mantido em condições assépticas com álcool 70% e clorexidina. (B) Após a realização da assepsia iniciamos a laparotomia mediana de aproximadamente 3 cm, variando conforme a variação anatômica do animal. (C) Após o procedimento o ceco é exposto da cavidade abdominal (D) tendo sido feita a punção do ceco abaixo da válvula íleo cecal (E,F,G). Fez-se necessário medir cautelosamente o ceco do animal em experimentação pois este parâmetro irá definir a gravidade da sepse experimental (I,J,K) após a determinação da gravidade da ligadura previamente citada, realizamos a perfuração. Optamos por realizar três furos com agulha calibre G22, e então o ceco foi reintroduzido na cavidade abdominal (L) e suturado com o fio de seda 4.0. (Fonte: Zaparolli et al; 2011.)

3.6 Pulverização dos órgãos captados.

Após laparotomia mediana e dissecação, o fígado foi removido, limpo em solução salina 0,9% e armazenado em tubos criogênicos em freezer -80°C. Esses tecidos foram homogeneizados em gral de aço inoxidável e resfriados

com nitrogênio líquido e pistilo de cerâmica, as amostras pulverizadas foram armazenadas em tubos de 1,5 mL.

3.7 Extração de mRNA.

O mRNA total dos órgãos pulverizados foi extraído com 1mL de Trizol (Invitrogen) em tubos de 1,5 mL, seguido de incubação de 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida adicionamos 200 uL de clorofórmio, os tubos foram agitados em *vortex* e incubados por 3 minutos em temperatura ambiente. Após incubação, as amostras passaram pelo processo de centrifugação (Eppendorf 5804R) a 4°C durante 15 minutos a 1200g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5mL, onde foi adicionado 500 uL de isopropanol gelado. Após a incubação por 10 minutos, repetimos a centrifugação a 4 °C por 15 minutos a 1200g. O sobrenadante foi desprezado e, ao *pellet* foi adicionado 1 mL de etanol gelado seguido de centrifugação a 4 °C durante 5 minutos a 7500g. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* reconstituído em 50 uL de água com 0,1% de Dietilpirocarbonato (Sigma) e armazenado em freezer -80 °C.

3.8 Quantificação da substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (Tbars).

A quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Tbars) foi utilizada para determinar a taxa de peroxidação lipídica. Amostras de 100 mg de tecidos foram homogeneizadas em 1 mL de KCl 1,15% e centrifugadas a 1000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado para dosagem que foi realizada com 100 uL de homogenato de tecido acrescida de 100 uL de SDS A 8,1%, 750 uL de ácido acético a 20% e 750 uL de ácido tiobarbitúrico a 0,8%.

A mistura foi aquecida a 90°C por 60 minutos. Após o tempo realizamos a leitura por espectrofotometria Teecom Genius, utilizando um comprimento de onda 532 nm. (Salzburg, Austrália).

3.9 Determinação da atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD).

O tecido macerado foi higienizado utilizando PBS gelado, para retirar a maior quantidade de células vermelhas poss, após, adicionou-se 5 mL/g de buffer lise gelado (5 mM de potássio fosfato, 0,1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100), após a mistura, centrifugou-se as amostras por 5 minutos a 12.0000 RPM a 4 graus, para realização do ensaio foi utilizado o sobrenadante das amostras.

3.10 Determinação da atividade enzimática de catalase.

Utilizou-se para a realização da reação 10 mg de tecido hepático, que foram homogeneizados em 200 ul de PBS gelado, centrifugado por 10 minutos a 14000 RPM e o sobrenadante foi utilizado no ensaio. Todos os reagentes do KIT estabeleceu temperatura ambiente antes de começar o experimento. Para realização da atividade enzimática, adicionou-se 5 uL de H₂O₂ a 3% e 914 ul de água deionizada em cada poço e foram incubados por 30 minutos. Para a detecção foram adicionados 102 ul de Assay buffer, 1 ul de reagente Dye e 1ul de HRP, incubando por 30 minutos seguido da adição de 100 ul de reagente de detecção e novamente incubado por 10 minutos, a leitura foi realizado em espectrofotômetro com densidade ótica de 570 nm.

3.11 Determinação da atividade enzimática de glutatona.

O macerado foi lavado com PBS gelado, os reagentes do kit permaneceram em temperatura ambiente para realização do ensaio. As amostras foram diluídas com água antes do ensaio e então foram separadas 120 ul da amostra adicionado-as em 120 ul de reagente A, em seguida as misturas passaram no vórtex, em seguida as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 4000 RPM, em seguida foram transferidos 200 ul dessa diluição e adicionado 200 ul de solução B e a placa foi levemente agitada, seguida da incubação de 25 minutos à temperatura ambiente e então foi realizada a leitura no espectrofotômetro à 412 nm.

3.12 Quantificação de nitrito.

Para determinação de nitrito utilizamos o protocolo do ensaio de Griess. Para realizar a curva padrão foi utilizado 69mg de nitrito de sódio diluído em 1 mL de água deionizada. Para fazer o primeiro ponto da curva de 200 uM utilizamos 40 uL da solução a 1mM e ressuspendemos em 200 ul de PBS. A diluição seriada ficou então: 200 uM; 100 uM; 50 uM; 25 uM; 12,5 uM; 6,25 uM; 3,125 uM. Utilizamos uma placa de 96 poços, na coluna esquerda adicionamos o branco da reação e os pontos da curva, nos outros poços adicionamos as amostras e a solução de Griess, incubamos por 10 minutos a temperatura ambiente e a leitura realizada em 540 nm.

3.13 Extração do DNA mitocondrial.

Para extração do DNA mitocondrial utilizamos o protocolo do kit do fabricante QIAGEN, utilizando aproximadamente 10 mg de tecido, adicionado em 180 μ L de ATL e agitadas em vórtex, em seguida foram adicionados 10 μ L de PROK e as amostras foram incubadas a 56°, após, foram adicionados 200 μ L de buffer AL, e novamente foram agitadas em vórtex, em seguida adicionamos 200 μ L de etanol absoluto, transferindo o conteúdo para coluna acoplando o tubo coletor e centrifugando por 2 minutos a 8000 rpm, em seguida realizou-se o descarte do tubo coletor, seguindo da adição de 500 μ L de buffer AW1, novamente realizando centrifugação a 8000 rpm por 2 minutos, logo após foram acrescentados 500 μ L de buffer AW2 e este conteúdo foi centrifugado a 14000 rpm, na sequência houve descarte deste tubo coletor para adição do buffer AW na coluna de 1,5 ml do fabricante Axygen, centrifugando a 8000 rpm e o conteúdo foi quantificado em Nanodrop.

3.14 quantificação de DNA mitocondrial.

As quantidades relativas de mitocôndrias do fígado de camundongos foram determinadas usando métodos quantitativos de PCR em tempo real (RT-PCR) descrito por Wong e Cortopassi em 2010. Os genes alvo foram fibrose cística nuclear (FC) e nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase-5 mitocondrial (ND-5).

As sequencias específicas para as espécies foram selecionados utilizando o Primer Express® Software (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para a quantificação de DNA nuclear, utilizou-se 10 ng de DNA como molde e para quantificação de DNA mitocondrial, utilizou-se 0,1 ng de DNA como modelo.

Utilizou-se um termociclador em tempo real ABI 7900HT acoplado com SYBR Green (Applied Biosystems) e os seguintes parâmetros de ciclagem: Fase 1, 50 ° C durante 2 minutos; Fase 2, 95 ° C durante 10 minutos; Estágio 3, 40 ciclos para 95 ° C durante 15 s, 60 ° C durante 1 minuto; E estágio 4, 95 ° C durante 15 s; 60 ° C durante 15 s, 95 ° C durante 12 s.

A linearidade da curva de amplificação foi analisada utilizando o ABI 7900HT Software e o tempo médio de ciclo da parte linear da curva foi designado (CT). Cada amostra foi analisada em duplicata.

3.14 Estatística.

A normalidade dos dados foi avaliada com os testes D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. A comparação entre os grupos foi realizada com a análise de variância de uma via (ANOVA) complementada pelo teste post-hoc de Turkey. A curva de sobrevivência foi avaliada pelo teste Log-Rank. O programa utilizado para estatística foi o Prism 5 for Windows, versão 5.0, GraphPad Software Inc, EUA. Os resultados são apresentados com média $\pm$ desvio padrão, sendo considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$.

4.0 Resultados

4.1 – Curva de sobrevida

A curva de sobrevida mostrou que todos os animais CLP morreram em até vinte e oito horas após o procedimento, enquanto o grupo TOL apresentou apenas uma morte em 32 horas (Figura 10).

Figura 9: Curva de sobrevida - Comparação dos grupos de animais controles e tolerantes. * $p < 0,05$ quando comparado ao basal do mesmo grupo. O teste utilizado para comparar as duas populações foi o logrank.

4.2 Quantificação do biomarcador malondialdeído (MDA) após reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARs) no tecido hepático.

A peroxidação lipídica, avaliada pela reação com o ácido tiobarbitúrico, mostrou-se maior nos grupos CLP eutanasiados após quatro e oito horas. Em 12 horas, a peroxidação lipídica foi similar entre os grupos.

Figura 10: Quantificação da reação do biomarcador malondialdeído (MDA), após reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARs), análise realizada no fígado, extraído 4, 8 e 12 horas após o procedimento de ligadura e punção cecal, Ω $p < 0,05$ quando comparado a outros grupos. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tolerante.

4.3 Quantificação de nitrito no tecido hepático.

Os níveis de nitrito no tecido hepático foram maiores no grupo CLP em 8 horas e no grupo CLPT em 12 horas após a sepse experimental, quando comparados aos respectivos controles.

Figura 11: Quantificação de nitrito de camundongos Balb-C, análise realizada no fígado após 4, 8 e 12 horas da ligadura e punção cecal * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

4.4 Quantificação de Dna mitocondrial no tecido hepático.

A quantidade de DNA mitocondrial permaneceu igual entre os grupos de quatro horas, houve diminuição no grupo CLPT8, os grupos CLP12 e CLPT12 mativeram-se diminuído quando comparados aos outros grupos do mesmo período.

Figura 12: Quantificação de DNA mitocondrial de camundongos Balb-C, análise realizada no fígado extraído após 4, 8 e 12 horas da ligadura e punção cecal * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tolerante.

4.5 Expressão de RNA mensageiro do gene da superóxido dismutase no tecido hepático.

Houve diminuição da expressão de RNAm no grupo CLPT4, os grupos CLP8, CLPT8, CLP12 e CLPT12 também mantiveram-se diminuídos quando comparada com seus respectivos controles.

Figura 13: Expressão relativa de RNA mensageiro do gene de superóxido dismutase de camundongos BALB-C, análise realizada no fígado extraído após 4, 8 e 12 horas da ligadura e punção cecal * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tolerante. Ω $p < 0,05$ quando comparado a outros grupos.

4.6 Atividade enzimática da Superóxido Dismutase no tecido hepático.

A atividade enzimática da superóxido dismutase aumentou no grupo CLPT4 quando comparado aos demais grupos, em oito horas o grupo tolerante manteve-se aumentado quando comparado ao controle e o grupo CLPT8 manteve-se aumentado em relação ao tolerante. Em 12 horas o grupo tolerante, manteve-se aumentado quando comparado aos outros grupos do mesmo período.

Figura 14: Atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase de camundongos Balb-C, análise realizada no fígado extraído após 4, 8 e 12 horas da ligadura e punção cecal * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tolerante. Ω $p < 0,05$ quando comparado a outros grupos.

4.7 Expressão relativa de RNA mensageiro do gene da Glutathione redutase no tecido hepático.

A expressão relativa do RNAm do controle aumentou quando comparada aos demais grupos em quatro horas. Em oito horas o grupo CLPT8 manteve-se aumentado quando comparado ao CLP8, em 12 horas o grupo controle manteve-se aumentado e o grupo CLPT12 foi maior que o grupo tolerante.

Figura 15: Expressão relativa de RNA mensageiro do gene da glutathione redutase de camundongos BALB-C, análise realizada no fígado extraído após 4, 8 e 12 horas da ligadura e punção cecal * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tolerante. Ω $p < 0,05$ quando comparado a outros grupos.

4.8 Expressão relativa de RNA mensageiro do gene da Glutathiona peroxidase no tecido hepático

O grupo controle apresentou menor expressão relativa de RNAm do gene da glutathiona peroxidase quando comparado ao grupo tolerante em quatro horas, o grupo CLPT4 manteve-se diminuído quando comparado ao grupo CLP4, o grupo tolerante aumentou em oito e doze horas quando comparado aos respectivos grupos do mesmo período.

Figura 16: Expressão relativa de RNA mensageiro do gene da glutathiona peroxidase de camundongos BALB-C, análise realizada no fígado extraído após 4, 8 e 12 horas da ligadura e punção cecal * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tolerante. Ω $p < 0,05$ quando comparado a outros grupos.

4.9 Atividade enzimática da Glutathione redutase no tecido hepático.

A atividade enzimática da glutathione redutase manteve-se igual nos diferentes grupos.

Figura 17: Atividade da enzima antioxidante glutathione redutase de camundongos Balb-C, análise realizada no fígado extraído após 4, 8 e 12 horas da ligadura e punção cecal.

4.10 Expressão relativa de RNA mensageiro do gene da Catalase no tecido hepático

A expressão relativa de RNAm do gene da catalase aumentou no grupo CLP4 quando comparado ao grupo controle, o grupo CLPT4 diminuiu quando comparado ao grupo CLP4. Em oito horas o grupo CLPT8 manteve-se diminuído quando comparado aos demais grupos do mesmo período e o grupo CLP8 diminuiu em relação ao seu respectivo controle, em doze horas o grupo CLP12 e CLPT12 mantiveram-se diminuído quando comparado aos demais grupos do mesmo período.

Figura 18: Expressão relativa de RNA mensageiro do gene da catalase de camundongos BALB-C, análise realizada no fígado extraído após 4, 8 e 12 horas da ligadura e punção cecal * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ quando comado ao grupo tolerante. Ω $p < 0,05$ quando comparado a outros grupos. ≠ $p < 0,05$ quando comparado ao grupo ligadura e punção cecal.

4.12 Atividade enzimática da Catalase no tecido hepático.

A atividade enzimática da catalase diminuiu no grupo controle quando comparado com o tolerante em quatro horas, o grupo CLPT4 também manteve-se diminuído em relação aos grupo CLP4 e o respectivo controle em oito e doze horas e o grupo controle esteve aumentado quando comparado aos demais grupos.

Figura 19: Atividade da enzima antioxidante catalase de camundongos Balb-C, análise realizada no fígado extraído após 4, 8 e 12 horas da ligadura e punção cecal. $\Omega p < 0,05$ quando comparado a outros grupo.

5.0 Discussão.

O sistema imunológico frente a sepse e ação da endotoxemia.

O sistema imunológico é o responsável por proteger o hospedeiro quando o mesmo encontra-se frente a microrganismos capazes de lhe causar danos. Quando há invasão de bactérias, fungos ou vírus as células imunes participam ativamente do processo inflamatório liberando diversos mediadores, para eliminar o agente agressor. O sistema imune pode desencadear uma inflamação exacerbada após a invasão de microrganismos e levar à síndrome da resposta inflamatória sistêmica e consequentemente a sepse. (Donnelly, JP; et al, 2017). Segundo o ILAS (Instituto Latinoamericano de Sepse), a doença é responsável por matar aproximadamente 400.000 pessoas por ano no Brasil, sendo a principal causa de morte de pacientes internados na unidade de terapia intensiva no país. O estudo da doença é extremamente importante, visando reduzir o tempo de internação e os casos de óbitos. Quando os microrganismos invadem o hospedeiro o sistema imunológico, rapidamente reconhece sua estrutura. Após a detecção do lipopolissacarídeo, um componente de bactéria gram-negativa, é desencadeada uma cascata de sinalização intracelular, ativando o NFkB e então induzindo a expressão de alguns genes, os quais irão participar efetivamente da resposta (T, Kawai; *et al*,2010; EM Reuven; *et al*, 2014; H, Hug; *et al*, 2018; SC, Lin; *et al*, 2010; T, Kawai; *et al*,2006; O'Neill; *et al*, 2007; T, Kawai; *et al*,2006).

A tolerância ao lipopolissacarídeo (LPS) é um mecanismo pouco estudado, mas, foi demonstrado, inclusive em nosso grupo de pesquisa que pequenas doses de lipopolissacarídeo em animais altera a capacidade de respostas posteriores a uma dose letal. (Nicollas N, et al; 2012. Lima TM; et al, 2014. Melo ES; et al, 2010).

Frente à grande importância da tolerância ao lipopolissacarídeo, fomos então confirmar a nossa hipótese através da curva de mortalidade pós ligadura e punção de ceco (CLP), um método consagrado em diversos laboratórios do mundo, e frequentemente usado por pesquisadores em nosso departamento. Nós optamos por causar a sepse experimental de moderada intensidade, e então verificamos o comportamento e a mortalidade dos animais ao longo das horas. Observamos que todos que pertenciam ao grupo naïve morreram em até vinte e oito horas após serem submetidos a ligadura e perfuração do ceco, enquanto o grupo de animais tolerantes apresentaram apenas uma morte após trinta e duas horas. Dessa forma conseguimos comprovar que a tolerância ao lipopolissacarídeo foi um mecanismo benéfico na imunoregulação da resposta inflamatória e protetor contra mortalidade.

A importância do equilíbrio das espécies reativas de oxigênio (EROS) e nitrogênio (ERN).

As espécies reativas de oxigênio (EROS) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) podem ser sintetizadas por diferentes fontes: NADPH, Xantina e mitocôndrias (DN, Granger; *et al*, 2015; G, Donald; *et al*, 2011; S, Helmut; *et al*,

2015). LANONE e colaboradores descreveram que a principal fonte de óxido nítrico na endotoxemia é a iNOS, induzida diretamente pelas citocinas pró inflamatórias. Há relatos na literatura que o NO induz uma alta produção de O₂, que por sua vez em altas concentrações de NO leva a formação de ONOO, causando diversos danos ao DNA mitocondrial, e outros importantes compartimentos celulares. Ao dosar o nitrito verificamos que os animais submetidos a tolerância e ligadura e punção cecal sendo eutanasiados após 8 horas, mantiveram-se iguais aos controles. Inversamente a isso, os animais submetidos apenas ao CLP sem tratamento prévio com LPS, apresentaram aumento significativo, nos indicando novamente que a tolerância tem um papel importante na regulação da produção das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, impedindo que haja excessos durante a resposta aos microrganismos e não danifique organelas celulares com funções importantes dentro do sistema imunológico. Após esses dados estatísticos importantes de nosso trabalho, verificamos a quantidade de mitocôndrias no fígado dos camundongos. Esta organela tem diversas atividades celular importante: faz a respiração aeróbia e sinalização com outras organelas, impactando em diferentes respostas como a divisão celular, diferenciação e até a morte programada (J, Duran-Bedolla; *et al*, 2015). Pesquisadores recentemente apontaram que doses não letais de lipopolissacarídeo (LPS) induzem marcadores de biogênese mitocondrial em cardiomiócitos e células não neuronais, entretanto, indicaram que o LPS tem efeito positivo, onde parece aumentar o conteúdo mitocondrial e melhoria no desempenho de sua função frente a um quadro infeccioso (I, Lee; *et al*, 2014). O grupo tolerante eutanasiado 4 horas pós ligadura e punção cecal não apresentaram diferença significativa

na quantidade de DNA mitocondrial quando comparado ao grupo controle, indicando que a tolerância manteve os níveis de respiração celular e protegeu a célula de danos piores. Quando a produção de radicais livres, espécies reativas de oxigênio (EROS) e/ou espécies reativas de nitrogênio (ERN), supera a força da ação dos antioxidantes, inicia-se rapidamente a oxidação de biomoléculas, nesse processo há formação dos biomarcadores do estresse oxidativo. (C, Yzydorczyk; *et al*, 2015). Em nosso trabalho focamos no biomarcador malondialdeído, formado a partir da peroxidação lipídica, ou seja, a sua disposição inicia-se durante a degradação lipídica da membrana celular (L, Leonardo; *et al*, 2013; WL, Scott; *et al*, 2014). O ácido araquidônico (AA), é liberado devido a ação das fosfolipases PLA2, então é atacado pelas espécies reativas de oxigênio (EROS), principalmente pelo radical hidroxila OH. Dessa forma este “endoperóxido” sofre uma quebra espontânea, começando a formação do Malondialdeído no espaço intercelular. (C, Yzydorczyk; *et al*, 2015). Os nossos resultados apontaram que o grupo de animais tolerantes ao LPS submetidos ao CLP em 4 e 8 horas, mantiveram-se com os mesmo níveis dos animais controles. Entretanto os animais que não receberam tratamento com pequenas doses de LPS (endotoxêmicos), aumentaram expressivamente a quantidade de malondialdeído indicando que sofreram mais peroxidação lipídica. Dessa forma, nosso estudo conseguiu demonstrar o efeito protetor causado pela tolerância ao lipopolissacarídeo frente a o oxidação de biomoléculas.

Estudo do equilíbrio REDOX.

A redução univalente do O₂ forma o ânion superóxido, espécie reativa de oxigênio (EROS), liberada pela célula imunológica durante a infecção. Contudo, a literatura descreve que a produção exacerbada destas espécies, além de exterminar os microrganismos, podem causar diversos danos celulares, e posterior falência de múltiplos órgãos. Para evitar eventuais danos, o organismo do ser vivo é dotado de diversas substâncias antioxidantes, que podem ser ingeridas através da dieta ou produzidas por células circulantes do sistema. Antes de estudarmos a atividade enzimática propriamente dita, verificamos como se estava a expressão gênica dos antioxidantes nas células do hospedeiro. Surpreendentemente verificamos que existem diferenças positivas da expressão relativa, nos diferentes genes das enzimas antioxidantes no fígado dos animais tolerantes, principalmente nos grupos que foram eutanasiados após as 4 horas do procedimento de ligadura e punção cecal. Conforme estudos recém publicados, sabe-se que o tratamento efetivo para a patologia nas primeiras 6 horas iniciais é muito importante para o sucesso do mesmo. Na prática hospitalar, há protocolos descritos por médicos intensivistas que exigem mais atenção neste intervalo.

Avaliarmos a atividade enzimática do produto final, isto corresponde a quantidade de proteína ativada, iniciamos a quantificação da em diferentes tempos. A superóxido dismutase (SOD) é encarregada em reduzir o superóxido em peróxido de hidrogênio. Esta enzima é subdividida em: SOD- Cu/Zn (Citoplasma), SOD- Mn (Mitocôndria) (K, Nakamura; *et al*, 1988; X, Lu; *et al*,

2015; H, Liu; *et al*, 2015; NG, Robinett; *et al*, 2018), e apresentou aumento positivo no grupo tolerante nas primeiras 4 horas. Para melhor elucidar o sistema redox fomos verificar a atividade enzimática da catalase, responsável por catalisar a decomposição de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (AJ, Pratt; *et al*, 2015; HT, Sepasi; *et al*, 2018; C, Glorieux; *et al*, 2017). Verificamos que a mesma esteve diminuída no grupo de animais que foram submetidos à tolerância e CLP e eutanasiados após 4 horas. A diminuição da atividade da catalase na tolerância é benéfico, para que a mesma não catalise todo o peróxido de hidrogênio, pois, esta espécie reativa de oxigênio é muito importante para o extermínio do microrganismo. A glutatona, uma importante enzima antioxidante manteve-se constante em todos os períodos preconizados para os devidos testes. Este equilíbrio das atividades das diferentes enzimas nos grupos tolerantes é de extrema importância, para homeostasia do sistema redox e acreditamos que esse mecanismo diminua os danos celulares e o estresse oxidativo.

6.0 Conclusão

- Houve diferença da expressão gênica em diversos tempos da sepse experimental nos animais tolerantes, acreditamos que para manter homeostase do organismo frente ao agente patogênico é necessária essa variação entre estas enzimas antioxidantes para não haver o estresse oxidativo, mostramos estes dados através da expressão gênica e a atividade proteica dos mesmos.
- Os animais tolerantes que foram submetidos ao procedimento de ligadura e punção cecal, mantiveram um importante equilíbrio na atividade enzimática em diferentes tempos. Efeito benéfico para a homeostasia do sistema redox, diminuindo os danos celulares causados pelo excesso de EROS/ERN

7.0 Referências bibliográfica

1. Wu H, Han D, Ma S, Fan W, Wang Y, Zhang R, Fan M, Huang Y, Fu X, Cao F. A Novel Mechanism of Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Protection against Sepsis: Restricting Inflammasome Activation in Macrophages by Increasing Mitophagy and Decreasing Mitochondrial ROS. *Oxid Med Cell Longev*. 2018 Feb 13;2018:3537609. doi: 10.1155/2018/3537609. eCollection 2018
2. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992 Jun;101(6):1644-55.
3. Abraham, E., 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): p. 232-5.
4. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS.2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003 Apr;31(4):1250-6.
5. Li S, Wu H, Han D, Ma S, Fan W, Wang Y, Zhang R, Fan M, Huang Y, Fu X, Cao F. A Novel Mechanism of Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Protection against Sepsis: Restricting Inflammasome Activation in Macrophages by Increasing Mitophagy and Decreasing Mitochondrial ROS. *Oxid Med Cell Longev*. 2018 Feb 13;2018:3537609. doi: 10.1155/2018/3537609. eCollection 2018
6. Alhashem F, Tiren-Verbeet NL, Alp E, Doganay M. Treatment of sepsis: What is the antibiotic choice in bacteremia due to carbapenem resistant Enterobacteriaceae? *World J Clin Cases*. 2017 Aug 16;5(8):324-332. doi:

10.12998/wjcc.v5.i8.324.

7. Stehr SN, Reinhart K. Sepsis as a global health problem-why we need a global sepsis alliance. *Shock*. 2013 May;39 Suppl 1:3-4. doi: 10.1097/SHK.0b013e31828fad61.

8. Peters A, Saito H, Borzykowski T, Kilpatrick C, Allegranzi B, Pittet D. Let's prevent sepsis in health care- The 5 May 2018 World Health Organization (WHO) SAVE LIVES: Clean Your Hands campaign. *J Infect*. 2018 May 2. pii: S0163-4453(18)30103-8. doi: 10.1016/j.jinf.2018.03.003.

9. Martischang R, Pires D, Masson-Roy S, Saito H, Pittet D. Promoting and sustaining a historical and global effort to prevent sepsis: the 2018 World Health Organization SAVE LIVES: Clean Your Hands campaign. *Crit Care*. 2018 Apr 13;22(1):92. doi: 10.1186/s13054-018-2011-3.

10. Tolonen M, Coccolini F, Ansaloni L, Sartelli M, Roberts DJ, McKee JL, Leppaniemi A, Doig CJ, Catena F, Fabian T, Jenne CN, Chiara O, Kubes P, Kluger Y, Fraga GP, Pereira BM, Diaz JJ, Sugrue M, Moore EE, Ren J, Ball CG, Coimbra R, Dixon E, Biffl W, MacLean A, McBeth PB, Posadas-Calleja JG, Di Saverio S, Xiao J, Kirkpatrick AW. Getting the invite list right: a discussion of sepsis severity scoring systems in severe complicated intra-abdominal sepsis and randomized trial inclusion criteria. *World J Emerg Surg*. 2018 Apr 6;13:17. doi: 10.1186/s13017-018-0177-2. eCollection 2018.

11. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K; International Forum of Acute Care Trialists. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Feb 1;193(3):259-72. doi: 10.1164/rccm.201504-0781OC.

12. Leligdowicz A, Dodek PM, Norena M, Wong H, Kumar A, Kumar A. Association between source of infection and hospital mortality in patients who have septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 May 15;189(10):1204-13.

doi: 10.1164/rccm.201310- 1875OC.

Tusgul S, Carron PN, Yersin B, Calandra T, Dami F. Low sensitivity of qSOFA, SIRS criteria and sepsis definition to identify infected patients at risk of complication in the prehospital setting and at the emergency department triage. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2017 Nov 3;25(1):108. doi: 10.1186/s13049-017-0449-y.

13. Finkelsztejn EJ, Jones DS, Ma KC, Pabón MA, Delgado T, Nakahira K, Arbo JE, Berlin DA, Schenck EJ, Choi AM, Siempos II. Comparison of qSOFA and SIRS for predicting adverse outcomes of patients with suspicion of sepsis outside the intensive care unit. *Crit Care.* 2017 Mar 26;21(1):73. doi: 10.1186/s13054-017-1658-5.

14. Hirschy R, Sterk E, Dobersztyn R, Rech MA. Time Spent in the Emergency Department and Outcomes in Patients With Severe Sepsis and Septic Shock. *Adv Emerg Nurs J.* 2018 Apr/Jun;40(2):94-103. doi: 10.1097/TME.000000000000188.

15. Dünser MW, Dubin A. There is more to septic shock than arterial hypotension and elevated lactate levels: another appeal to rethink current resuscitation strategies! *Ann Intensive Care.* 2018 Apr 27;8(1):55. doi: 10.1186/s13613-018-0406-6.

16. Russell JA, Boyd J, Nakada T, Thair S, Walley KR. Molecular mechanisms of sepsis. *Contrib Microbiol.* 2011;17:48–85.

17. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969 Nov 25;244(22):6049-55.

18. Van Raamsdonk JM, Hekimi S. Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Apr 10;109(15):5785-90. doi: 10.1073/pnas.1116158109. Epub 2012 Mar 26.

19. Tohru Fukai, Masuko Ushio-Fukai. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid Redox Signal.*

- 2011 Sep 15; 15(6): 1583–1606. doi: 10.1089/ars.2011.3999
20. Jeremy Michael Van Raamsdonk and Siegfried Hekimi· Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 10; 109(15): 5785–5790.
21. Anja Konzack, Mirza Jakupovic, Kateryna Kubaichuk, Agnes Görlach, Frank Dombrowski, Ilkka Miinalainen, Raija Sormunen, and Thomas Kietzmann· Mitochondrial Dysfunction Due to Lack of Manganese Superoxide Dismutase Promotes Hepatocarcinogenesis. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Nov 10; 23(14): 1059– 1075.doi: 10.1089/ars.2015.6318.
22. Xin Gen Lei, Jian-Hong Zhu, Wen-Hsing Cheng, Yongping Bao, Ye-Shih Ho, Amit R. Reddi, Arne Holmgren, and Elias S. J. ArnérParadoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Feb 1;193(3):259-72. doi: 10.1164/rccm.201504-0781OC.
23. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev*. 2012;249:158–17.
24. Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. The incidence and outcome of sepsis were estimated using four different published methods; depending on the methods of data abstraction, the incidence of sepsis in the United States could vary as much as 3.5-fold. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med*. 2013;41:1167–1174.
25. Casserly B, et al. Lactate measurements in sepsis-induced tissue hypoperfusion: results from the Surviving Sepsis Campaign database. *Crit Care Med*. 2015;43:567–573.
26. Sato R, Nasu M. A review of sepsis-induced cardiomyopathy. *J Intensive Care*. 2015;3:48.
27. Ricci Z, Polito A, Polito A, Ronco C. The implications and management of septic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7:218–225.
28. Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the

incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med* 2013; 41:1167-74.

29. Kasza.A.IL1 and EGF regulate expression of genes important in inflammation and cancer. *Cytokine*. 2013 Apr;62(1):22-33. doi: 10.1016/j.cyto.2013.02.007. Epub 2013 Mar 6.

30. Mradul Kumar Daga, Naushad Ahmad Khan, Harpreet Singh, Ankit Chhoda, Sahil Mattoo, andBasant Kumar Gupta. Markers of Oxidative Stress and Clinical Outcome in Critically ill Septic Patients: A Preliminary Study from North India. *J Clin Diagn Res*. 2016 Aug; 10(8): OC35–OC38.

31. Hongjun Jin, Bobbie-Jo Webb-Robertson, Elena S. Peterson, Ruimin Tan, Diana J. Bigelow, Mary Beth Scholand, John R. Hoidal, Joel G. Pounds, and Richard C. Zangar. Smoking, COPD, and 3-Nitrotyrosine Levels of Plasma Proteins. *Environ Health Perspect*. 2011 Sep; 119(9): 1314–1320.

32. Ahsan H. 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Hum Immunol*. 2013 Oct;74(10):1392-9. doi: 10.1016/j.humimm.2013.06.009. Epub 2013 Jun 15

33. Khan MA, Alam K, Zafaryab M, Rizvi MMA.Peroxynitrite-modified histone as a pathophysiological biomarker in autoimmune diseases. *Biochimie*. 2017 Sep;140:1-9. doi: 10.1016/j.biochi.2017.06.006. Epub 2017 Jun 12.

34. Jun Yan, Song Li, and Shulin Li. The role of the liver in sepsis. *Int Rev Immunol*. 2014 Nov-Dec; 33(6): 498–510. Published online 2014 Mar 10. doi: 10.3109/08830185.2014.889129.

35. Bauer M, Press AT, Trauner M. The liver in sepsis: patterns of response and injury. *Curr Opin Crit Care*. 2013 Apr;19(2):123-7. doi: 10.1097/MCC.0b013e32835eba6d.

36. Dimitrios P. Bogdanos, Bin Gao, and M. Eric Gershwin. Liver Immunology. - *Compr Physiol*. Author manuscript; available in PMC 2014 Oct 17.Published in final edited form as:*Compr Physiol*. 2013 Apr; 3(2): 567–598. doi: 10.1002/cphy.c120011

37. Doherty DG. Immunity, tolerance and autoimmunity in the liver: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2016 Jan;66:60-75. doi: 10.1016/j.jaut.2015.08.020. Epub 2015 Sep 7.
38. P. Nasa, D. Juneja, O. Singh Severe sepsis and septic shock in the elderly: An overview *World J. Crit. Care Med.*, 1 (1) (2012), pp. 23-30
39. P. Nasa, D. Juneja, O. Singh. Severe sepsis and septic shock in the elderly: An overview *World J. Crit. Care Med.*, 1 (1) (2012), pp. 23-30.
40. Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, Ali MM, McGuire F, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo.* 2013 Nov-Dec;27(6):669-84.
41. Delano MJ, Ward PA². The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. *Immunol Rev.* 2016 Nov;274(1):330-353. doi: 10.1111/imr.12499.
42. Shannon M. Wallet, Vishwajeet Puri, and Frank C. Gibson, III, Linkage of Infection to Adverse Systemic Complications: Periodontal Disease, Toll-Like Receptors, and Other Pattern Recognition Systems. *Vaccines (Basel).* 2018 Apr 5;6(2). pii: E21. doi: 10.3390/vaccines6020021.
43. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010;140(6):805–20. pmid:20303872.
44. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373–84. pmid:20404851.
45. Wallet SM, Puri V, Gibson FC. Linkage of Infection to Adverse Systemic Complications: Periodontal Disease, Toll-Like Receptors, and Other Pattern Recognition Systems. *Vaccines (Basel).* 2018 Apr 5; 6(2).
46. Vidya MK, Kumar VG, Sejian V, Bagath M, Krishnan G, Bhatta R. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals.

Int Rev Immunol. 2018 Jan 2; 37(1):20-36.

47. Reuven EM, Fink A, Shai Y. Regulation of innate immune responses by transmembrane interactions: lessons from the TLR family. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jun; 1838(6):1586-93.

48. Hug H, Mohajeri MH, La Fata G. Toll-Like Receptors: Regulators of the Immune Response in the Human Gut. *Nutrients*. 2018 Feb 13; 10(2):.

49. Lin SC, Lo YC, Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*. 2010 Jun 17; 465(7300):885-90.

50. Kawai, T. and S. Akira, TLR signaling. *Cell Death Differ*, 2006. 13(5): p. 816- 25.

51. O'Neill, L.A. and A.G. Bowie, The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 2007. 7(5): p. 353.64.

52. Kawai, T. and S. Akira, TLR signaling. *Cell Death Differ*, 2006. 13(5): p. 816-25.

53. Zhang S, Yu M, Guo Q, Li R, Li G, Tan S, Li X, Wei Y, Wu M. Annexin A2 binds to endosomes and negatively regulates TLR4-triggered inflammatory responses via the TRAM-TRIF pathway. *Sci Rep*. 2015 Nov 3; 5():15859.

54. Ren Y, Zhang J, Dong W, Yang H, Pan B, Bu W. Evolutionary and functional analysis of *Cyclina sinensis* c-Jun AP-1 gene in response to LPS stimulation. *Dev Comp Immunol*. 2018 Jul 3;88:1-7. doi: 10.1016/j.dci.2018.06.015.

55. Ren Y, Ding D, Pan B, Bu W. The TLR13-MyD88-NF- κ B signalling pathway of *Cyclina sinensis* plays vital roles in innate immune responses. *Fish Shellfish Immunol*. 2017 Nov;70:720-730. doi: 10.1016/j.fsi.2017.09.060. Epub 2017 Sep 25. Corrigendum to "European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS)" [*Redox Biol*. 13 (2017) 94-162]. Egea J, Fabregat I, Frapart YM, Ghezzi P, Görlach A, Kietzmann T, Kubaichuk K, Knaus UG, Lopez MG, Olaso-Gonzalez G, Petry A, Schulz R, Vina J, Winyard P, Abbas K, Ademowo OS, Afonso CB, Andreadou I, Antelmann H, Antunes F, Aslan M, Bachschmid MM, Barbosa RM, Belousov V, Berndt C, Bernlohr D, Bertrán E,

Bindoli A, Bottari SP, Brito PM, Carrara G, Casas AI, Chatzi A, Chondrogianni N, Conrad M, Cooke MS, Costa JG, Cuadrado A, My- Chan Dang P, De Smet B, Debelec-Butuner B, Dias IHK, Dunn JD, Edson AJ, El Assar M, El-Benna J, Ferdinandy P, Fernandes AS, Fladmark KE, Förstermann U, Giniatullin R, Giricz Z, Görbe A, Griffiths H, Hampl V, Hanf A, Herget J, Hernansanz-Agustín P, Hillion M, Huang J, Ilikay S, Jansen-Dürr P, Jaquet V, Joles JA, Kalyanaraman B, Kaminsky D, Karbaschi M, Kleanthous M, Klotz LO, Korac B, Korkmaz KS, Koziel R, Kračun D, Krause KH, Křen V, Krieg T, Laranjinha J, Lazou A, Li H, Martínez-Ruiz A, Matsui R, McBean GJ, Meredith SP, Messens J, Miguel V, Mikhed Y, Milisav I, Milković L, Miranda-Vizuet A, Mojović M, Monsalve M, Mouthuy PA, Mulvey J, Münzel T, Muzykantov V, Nguyen ITN, Oelze M, Oliveira NG, Palmeira CM, Papaevgeniou N, Pavićević A, Pedre B, Peyrot F, Phylactides M, Pircalabioru GG, Pitt AR, Poulsen HE, Prieto I, Rigobello MP, Robledinos-Antón N, Rodríguez- Mañas L, Rolo AP, Rousset F, Ruskovska T, Saraiva N, Sasson S, Schröder K, Semen K, Seredenina T, Shakirzyanova A, Smith GL, Soldati T, Sousa BC, Spickett CM, Stancic A, Stasia MJ, Steinbrenner H, Stepanić V, Steven S, Tokatlidis K, Tuncay E, Turan B, Ursini F, Vacek J, Vajnerova O, Valentová K, Van Breusegem F, Varisli L, Veal EA, Yalçın AS, Yelisyyeva O, Žarković N, Zatloukalová M, Zielonka J, Touyz RM, Papapetropoulos A, Grune T, Lamas S, Schmidt HHHW, Di Lisa F, Daiber A. Redox Biol. 2018 Apr;14:694-696. doi: 10.1016/j.redox.2017.10.001. Epub 2017 Oct 26.

56. D. Neil Granger and Peter R. Kvietys . Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept· Published online 2015 Oct 8. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.020

57. Donald G. Buerk, Kenneth A. Barbee, and Dov Jaron. Nitric Oxide Signaling in the Microcirculation. Crit Rev Biomed Eng. 2011; 39(5): 397–433.

58. Helmut Sies. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine.

Redox Biol. 2015 Apr; 4: 180–183.

59. Nakamura K, Nakajima Y, Nakamura Y. Characterization of two similar differential tumor markers based on phosphofructokinase activity arising from the influence of cancer patient serum. *Cancer Detect Prev.* 1988;13(3-4):239-50.

60. Lu X, Wang C, Liu B. The role of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix*. *Fish Shellfish Immunol.* 2015 Jan;42(1):58-65. doi: 10.1016/j.fsi.2014.10.027. Epub 2014 Oct 30.

61. Liu H, He J, Chi C, Gu Y. Identification and analysis of icCu/Zn-SOD, Mn-SOD and ecCu/Zn-SOD in superoxide dismutase multigene family of *Pseudosciaena crocea*. *Fish Shellfish Immunol.* 2015 Apr;43(2):491-501. doi: 10.1016/j.fsi.2015.01.032. Epub 2015 Jan 31.

62. Robinett NG, Peterson RL, Culotta VC. Eukaryotic copper-only superoxide dismutases (SODs): A new class of SOD enzymes and SOD-like protein domains. *J Biol Chem.* 2018 Mar 30;293(13):4636-4643. doi: 10.1074/jbc.TM117.000182. Epub 2017 Dec 19.

63. Pratt AJ, DiDonato M, Shin DS, Cabelli DE, Bruns CK, Belzer CA, Gorringer AR, Langford PR, Tabatabai LB, Kroll JS, Tainer JA, Getzoff ED. Structural, Functional, and Immunogenic Insights on Cu,Zn Superoxide Dismutase Pathogenic Virulence Factors from *Neisseria meningitidis* and *Brucella abortus*. *J Bacteriol.* 2015 Dec;197(24):3834-47. doi: 10.1128/JB.00343-15. Epub 2015 Oct 12.

64. Sepasi Tehrani H, Moosavi-Movahedi AA. Catalase and its mysteries. *Prog Biophys Mol Biol.* 2018 Mar 9. pii: S0079-6107(17)30293-6. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2018.03.001.

65. Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem.* 2017 Sep 26;398(10):1095-1108. doi: 10.1515/hsz-2017-0131.

66. Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J, Calderon PB. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radic Biol Med*. 2015 Oct;87:84-97. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.017. Epub 2015 Jun 25.
67. Kedrowski BL, Gutow JH, Stock G, Smith M, Jordan C, Masterson DS. Glutathione reductase activity with an oxidized methylated glutathione analog. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2014 Aug;29(4):491-4. doi: 10.3109/14756366.2013.805757. Epub 2013 Jul 1.
68. Kantor ED, Ulrich CM, Owen RW, Schmezer P, Neuhouser ML, Lampe JW, Peters U, Shen DD, Vaughan TL, White E. Specialty supplement use and biologic measures of oxidative stress and DNA damage. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013 Dec;22(12):2312-22. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0470. Epub 2013 Aug 5.
69. Poljsak B, Šuput D, Milisav. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013():956792.
70. Chandrasekaran A, Idelchik MDPS, Melendez JÁ. Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biol*. 2017 Apr; 11():91-102.
71. Zyzdorzcyk C, Mitanchez D, Buffat C, Ligi I, Grandvullemin I, Boubred F, Simeoni U. Oxidative stress after preterm birth: origins, biomarkers, and possible therapeutic approaches. *Arch Pediatr*. 2015 Oct;22(10):1047-55. doi: 10.1016/j.arcped.2015.05.019. Epub 2015 Jul 2.
72. Leonardo Lorente, María M Martín, Pedro Abreu-González, Alberto Domínguez-Rodríguez, Lorenzo Labarta, César Díaz, Jordi Solé-Violán, José Ferreres, Judith Cabrera, Jose Carlos Igeño, and Alejandro Jiménez· Sustained high serum malondialdehyde levels are associated with severity and mortality in septic patients. *Crit Care*. 2013; 17(6): R290.
73. Scott L Weiss and Clifford S Deutschman. Elevated malondialdehyde

- levels in sepsis - something to 'stress' about? *Crit Care*. 2014; 18(2): 125.
74. Invernizzi P. Liver auto-immunology: the paradox of autoimmunity in a tolerogenic organ. *J Autoimmun*. 2013 Oct;46:1-6. doi: 10.1016/j.jaut.2013.08.006. Epub 2013 Sep 5.
 75. Córdoba-Moreno MO, Todero MF, Fontanals A, Pineda G, Daniela M, Yokobori N, Ramos MV, Barrientos G, Toblli JE, Isturiz MA, Rearte B. Consequences of the Lack of IL-10 in Different Endotoxin Effects and its Relationship with Glucocorticoids. *Shock*. 2018 Jul 23. doi: 10.1097/SHK.0000000000001233.
 76. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K; International Forum of Acute Care Trialists. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Feb 1;193(3):259-72. doi: 10.1164/rccm.201504-0781OC.
 77. Dorn GW , Vega RB, Kelly DP. Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart. *Genes Dev*. 2015 Oct 1;29(19):1981-91. doi: 10.1101/gad.269894.115.
 78. Duran-Bedolla J, Montes de Oca-Sandoval MA, Saldaña-Navor V, Villalobos- Silva JA, Rodriguez MC, Rivas-Arancibia S. Sepsis, mitochondrial failure and multiple organ dysfunction. *Clin Invest Med*. 2014 Apr 1;37(2):E58-69.
 79. Lee I, Hüttemann M. Energy crisis: the role of oxidative phosphorylation in acute inflammation and sepsis. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Sep;1842(9):1579-86. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.05.031. Epub 2014 Jun 4.
 80. Rios EC, de Lima TM, Moretti AI, Soriano FG. The role of nitric oxide in the epigenetic regulation of THP-1 induced by lipopolysaccharide. *Life Sci*. 2016 Feb 15;147:110-6. doi: 10.1016/j.lfs.2016.01.041. Epub 2016 Jan 27.
 81. de Lima TM, Sampaio SC, Petroni R, Brigatte P, Velasco IT, Soriano FG. Phagocytic activity of LPS tolerant macrophages. *Mol Immunol*. 2014 Jul;60(1):8- 13. doi: 10.1016/j.molimm.2014.03.010. Epub 2014 Apr 13.

82. Ariga SK, Abatepaulo FB, Melo ES, Velasco IT, Pinheiro da Silva F, de Lima TM, Soriano FG. Endotoxin tolerance drives neutrophil to infectious site. *Shock*. 2014 Aug;42(2):168-73. doi: 10.1097/SHK.0000000000000175.
83. Melo ES, Barbeiro HV, Ariga S, Goloubkova T, Curi R, Velasco IT, Vasconcelos D, Soriano FG. Immune cells and oxidative stress in the endotoxin tolerance mouse model. *Braz J Med Biol Res*. 2010 Jan;43(1):57-67. Epub 2009 Dec 18.
84. Foster, S.L., D.C. Hargreaves, and R. Medzhitov, Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*, 2007. 447(7147): p. 972-8.
85. Hitchler, M.J. and F.E. Domann, An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Radic Biol Med*, 2007. 43(7): p. 1023-36.
86. Jenuwein, T. and C.D. Allis, Translating the histone code. *Science*, 2001. 293(5532): p. 1074-80.
87. Fischle, W., Y. Wang, and C.D. Allis, Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. 15(2): p. 172-83.
88. Bartova, E., et al., Nuclear levels and patterns of histone H3 modification and HP1 proteins after inhibition of histone deacetylases. *J Cell Sci*, 2005. 118(Pt 21): p. 5035-46.