

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

FERNANDA MAJOLO

**ESTUDO ASSOCIATIVO ENTRE VARIANTES GENÉTICAS NO GENE *GPX1*, PARTICIPANTE DA VIA DE
CONTROLE OXIDATIVO, E O DESFECHO DE PACIENTES CRÍTICOS.**

Porto Alegre

2014

FERNANDA MAJOLO

**ESTUDO ASSOCIATIVO ENTRE VARIANTES GENÉTICAS NO GENE *GPX1*, PARTICIPANTE DA VIA DE
CONTROLE OXIDATIVO, E O DESFECHO DE PACIENTES CRÍTICOS.**

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular da
Faculdade de Biotecnologia da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: CLARICE SAMPAIO ALHO

Porto Alegre

2014

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a. Clarice Sampaio Alho pela orientação e ensinamentos.

Aos colegas de laboratório, em especial à Aline Ponzoni, que me ensinou as técnicas de laboratório e auxiliou nas genotipagens, à Débora Soares Bispo Santos Silva e Fernanda Rosa Sawitzki que tiveram paciência nas dúvidas.

Ao meu namorado Guilherme Liberato da Silva, por todo apoio, ajuda e compreensão durante a execução deste estudo.

A todos os professores e aos amigos do Laboratório de Genética Humana e Molecular.

RESUMO

Contexto: Durante a doença crítica e sepse há depleção grave de antioxidantes, e esse cenário aumenta o risco de mortalidade do paciente criticamente doente. Glutathione peroxidase (GPx) é uma das primeiras enzimas de defesa antioxidantes endógenas que, agindo em cooperação sinérgica com a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), desintoxica radicais livres no ambiente celular. Os estudos genéticos são importantes para compreender a complexidade do estresse oxidativo humano e como o organismo responde a situações extremas, como no caso das situações críticas de saúde. Estudos anteriores com uma variante SNP (*single nucleotide polymorphism*) no interior do gene *GPx1* (593C>T SNP; rs1050450; variante proteica na *GPx1*: Pro198Leu) mostraram que os portadores do alelo 593T e os homozigotos 593TT apresentam maior risco de desenvolver quadros patológicos graves. *Objetivo:* avaliar a relação da distribuição dos genótipos do SNP 593C>T *GPx1* em pacientes criticamente doentes buscando associações com seus quadros de gravidade (disfunções orgânicas, sepse e choque séptico) e desfecho (mortalidade), durante o período de sua internação na unidade de terapia intensiva (UTI). *Resultados:* Foram monitorados diariamente 626 pacientes criticamente doentes desde a sua admissão na UTI até sua alta hospitalar ou óbito. Foi identificada uma associação significativa entre o genótipo 593TT *GPx1* e a mortalidade: a taxa de mortalidade foi superior em homozigotos 593TT *GPx1* (N = 94) quando comparados com o grupo de indivíduos com genótipos 593CT ou 593CC *GPx1* (N = 532) (52% versus 38%, P = 0.009; OR = 1.79; 95% CI = 1.13-2.85). Avaliando o subgrupo de pacientes críticos com sepse, uma análise conjunta incluindo duas variantes genéticas *GPx1* e *SOD2* (47C>T SNP; rs4880; variante proteica na MnSOD: Ala-9Val) mostrou diferença significativa em relação a evolução para choque séptico. A frequência de choque séptico entre pacientes sépticos com alelos 593T *GPx1* e 47C *SOD2* (N = 122) foi superior quando comparado com pacientes sépticos com outras configurações de genótipos (N = 174) (78% versus 66%; P = 0.028; OR = 1.81; 95% CI = 1.03-3.18). Aceitando que os efeitos funcionais causados pelas variantes genéticas 593C>T *GPx1* e 47C>T *SOD2* em seus genes e nas enzimas GPx1 e MnSOD, respectivamente, afetam diretamente o balanço oxidativo celular, acreditamos que o resultado do presente estudo pode ser considerado como uma contribuição importante para a compreensão do estresse oxidativo no paciente criticamente doente.

PALAVRAS-CHAVE:

Paciente crítico; *GPx1*; UTI; sepse; choque séptico; *SOD2*

ABSTRACT

Background: During critical illness and sepsis there is severe antioxidant depletion, and this scenario raises the critical ill patient's mortality risk. Glutathione peroxidase (GPx) is one of the first endogenous antioxidant defense enzymes, and it works cooperatively with superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) to detoxify free radicals from the cellular environment. Genetic studies are important to understand the complexity of human oxidative stress and how the organism responds to an extreme situation such as critically care conditions. Previous studies with a *GPx1* single nucleotide polymorphism (593C>T SNP; rs1050450; protein variant in GPx1: Pro198Leu) showed 593T carriers and 593TT homozygotes present higher risk to develop different diseases. *Objective:* We assessed the relationship of the genotype distribution of *GPx1* SNP in critically ill patients with their conditions (organ dysfunction, sepsis, and septic shock) and their outcome. *Results:* We monitored 626 critically ill patients daily from the ICU (intensive care unit) admission to their discharge from hospital, or death. Our study revealed a significant association between 593TT *GPx1* genotype and mortality; the mortality rate was higher in homozygous 593TT *GPx1* (N = 94) when compared with the group of subjects with genotypes 593CT or 593CC *GPx1* (N = 532) (52% versus 38%, P = 0.009; OR = 1.79; 95% CI = 1.13-2.85). Evaluating the subgroup of 293 ICU patients with sepsis, a pooled analysis including two genetic variants *GPx1* and *SOD2* (47C> T SNP, rs4880; protein variant in MnSOD: Ala-9Val) showed a significant difference in relation to progression to septic shock. The frequency of septic shock among septic patients with 593T *GPx1* and 47C *SOD2* alleles (N = 122) was higher when compared with septic patients carrying other settings of genotypes (N = 174) (78% versus 66%; P = 0.028; OR = 1.81; 95% CI = 1.03-3.18). Accepting the previously reported functional effects of these two SNPs on *GPx1* and *SOD2* gene expressions and, consequently, on GPx1 and MnSOD enzyme activities, we believe our results may be considered as an important contribution for the understanding of oxidative imbalance during the critical ill.

KEYWORDS:

Critical illness; *GPx1*; ICU; sepsis; septic shock; *SOD2*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Estudos recentes com o polimorfismo <i>GPx1</i> 593C>T em diferentes condições _____ | 7 |
| Table 1: Recent studies with 593C>T <i>GPx1</i> polymorphism in different conditions _____ | 27 |
| Table 2: Critically ill patients' clinical and demographic data according to the 593C>T <i>GPx1</i> SNP genotype groups _____ | 28 |

LISTA DE SIGLAS

CAT - Catalase
CEP-PUCRS - Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
DNA - Desoxyribonucleic Acid
EAOs - Enzimas Antioxidantes
ERNS - Espécies reativas de nitrogênio
EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
GPx - Glutathione peroxidase
HSL-PUCRS - Hospital São Lucas – PUCRS
H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio
MnSOD - Superóxido Dismutase dependente de Manganês
MODS - Multiple Organ Dysfunction Syndrome
MOF - Multiple Organ Failure
NADPH - Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NCBI - National Center of Biotechnology Information
NO - Nitric Oxide
O₂ - Oxigênio molecular
O₂⁻ - Superóxido
PCR - Polymerase chain reaction
RL - Radicais Livres
SIRS - Systemic Inflammatory Response Syndrome – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SNPs - Single Nucleotide Polymorphisms
SOD - Superóxido dismutase
TCLE - Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TLRs - Toll-like receptors
TNF- α - Tumor Necrosis Factor Alpha – Fator de Necrose Tumoral Alfa
UTI - Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS | 1 |
| 1- REFERENCIAL TEÓRICO | 1 |
| Paciente crítico internado em UTI | 1 |
| Estresse oxidativo no paciente crítico | 2 |
| Glutathiona peroxidase 1 (GPx1) e o polimorfismo 593 C>T no gene <i>GPx1</i> | 6 |
| Superóxido dismutase dependente de manganês e o polimorfismo 47 C>T no gene <i>SOD2</i> | 8 |
| Medicina genômica - paciente crítico e genes <i>GPx1</i> e <i>SOD2</i> | 9 |
| 2- OBJETIVOS | 11 |
| CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO | 12 |
| CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS | 29 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 32 |

CAPÍTULO 1

1- REFERENCIAL TEÓRICO

PACIENTE CRÍTICO INTERNADO EM UTI

Os pacientes críticos são pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e caracterizam-se por apresentar um quadro patológico crítico e complexo, decorrente de fragilidades fisiológicas graves (Vincent, 2002). A doença crítica é qualquer condição que exige o apoio de sistemas de órgãos não vitais, sem os quais a sobrevivência não seria possível. Esta condição com risco de vida, que pode ser provocada por trauma, cirurgia extensa ou doenças médicas graves, é um exemplo final de estresse físico agudo e grave. Se o início da recuperação não segue dentro de alguns dias de tratamento intensivo, a doença crítica pode tornar-se prolongada e o suporte de órgãos vitais é frequentemente necessário ser usado durante semanas (Van den Berghe, 2003). Em pacientes criticamente doentes, deficiências nutricionais podem predispor os pacientes a função imunitária debilitada e maior risco de desenvolver complicações infecciosas, disfunção orgânica e até morte. A alimentação não reverte o desperdício contínuo de proteína do músculo esquelético e dos órgãos sólidos, o que provoca uma diminuição das funções vitais e fraqueza, e atrasa ou dificulta a recuperação do paciente (Streat *et al.*, 1987; Carrol, 1999). Apesar do tratamento adequado e bem sucedido da doença subjacente, a dependência de cuidados intensivos persiste e a susceptibilidade do paciente crítico a complicações potencialmente letais aumenta. A mortalidade pela doença crítica é alta: cerca de três em cada 10 pacientes adultos com uma estadia de terapia intensiva de mais de três semanas não sobrevivem (Van den Berghe *et al.*, 2000).

A sepse é caracterizada por múltiplas manifestações que podem determinar disfunção ou falência de um ou mais órgãos, e é uma das principais causas de mortalidade em pacientes internados na UTI, e segue ocorrendo apesar das melhorias em terapias de suporte e do uso de antimicrobianos estarem sendo constantemente introduzidas (Bernard *et al.*, 2001; Guha e Mackman, 2001). É resultado do desempenho excessivo da resposta imunitária celular que se manifesta clinicamente como Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) e a alteração da resposta imune, conduzindo para uma disfunção generalizada e ainda para o aumento na susceptibilidade a infecções (Crimi *et al.*, 2006). A sepse afeta aproximadamente 18 milhões de pessoas anualmente, com taxa de mortalidade de 25% para casos não complicados e de 80% em pacientes que desenvolvem Falência Múltipla de Órgãos/Síndrome da Disfunção Orgânica Múltipla (MOF/MODS) (Galley *et al.*, 2010). Um estudo realizado na região sul do Brasil em pacientes sépticos que evoluíram para choque séptico admitidos em UTI, durante os anos de 2003 e 2004, mostrou incidência de mortalidade de 66,5% (Dias *et al.*, 2007).

ESTRESSE OXIDATIVO NO PACIENTE CRÍTICO

Durante os processos das vias do metabolismo celular, o oxigênio remove elétrons de outras moléculas na célula formando as espécies reativas de oxigênio (EROs - que são tanto radicais livres ou espécies moleculares capazes de gerar radicais livres) cuja ação é potencialmente prejudicial a célula pois causa dano a proteínas, lipídeos, e ácidos nucléicos. Embora o DNA seja uma molécula estável, bem protegida no interior do núcleo celular, EROs invadem o ambiente nuclear, interagem com o DNA e causam diferentes tipos de danos, tais como a modificação de bases do DNA, quebras simples e duplas de DNA, perda de purinas e danos ao sistema de reparo de DNA (Beckman, *et al.*, 1997). Tais danos ao DNA induzem a uma descompensação celular que pode levar a apoptose e/ou a necrose celular, e consequentes danos teciduais. Indicadores de produção de EROs e de atividade antioxidante têm sido estudados em várias doenças: doenças como desordens cardiovascular (Griendling *et al.*, 1998; Schoonover *et al.*, 2001) e diabetes mellitus (Giugliano *et al.*, 1996) estão ligadas à formação de EROs e a um claro desequilíbrio redox.

Na diabetes mellitus pode haver uma diminuição na quantidade de glutathione eritrocitária e um aumento na peroxidação lipídica que contribui para as complicações fisiológicas da doença. No caso da diabetes, por exemplo, foi demonstrado que uma regulada ação de enzimas antioxidantes (EAOs), por sua vez, poderia contrabalançar o efeito negativo de alto teor de glicose na função da célula endotelial (Giugliano *et al.*, 1996). Além de serem reconhecidas como um importante fator contribuinte em nestas e em outras doenças de gravidade elevada, as EROs estão presentes em elevado nível nos pacientes criticamente doentes.

Pacientes criticamente doentes sofrem de estresse oxidativo causado pelas mesmas espécies reativas de oxigênio (EROs) e as de nitrogênio (ERNs) (Jeevanandam *et al.*, 2000). Embora EROs/ERNs sejam constantemente produzidas sob circunstâncias normais, a doença crítica aumenta drasticamente sua produção, e a há ainda certa incapacidade de ocorrer sua degradação pela atividade incompleta das enzimas antioxidantes. Cada vez mais, o estresse oxidativo está sendo reconhecido como ator fundamental na fisiopatologia subjacente da doença crítica, especialmente no desenvolvimento de falência de órgãos.

Os processos inflamatórios envolvem células, mediadores inflamatórios, citocinas, substâncias pró-inflamatórias, óxido nítrico (NO), e radicais livres de oxigênio, os quais, em conjunto mediam e induzem lesões de órgãos levando à falência de órgãos (Kotsovolis *et al.*, 2010; Schulte *et al.*, 2011). Se o suprimento de oxigênio não estiver alinhado com as exigências metabólicas normais dos tecidos, por qualquer motivo, haverá hipóxia tecidual, resultando em lesão celular e/ou morte. Contudo, mesmo que a disponibilidade de oxigênio não esteja comprometida, existem evidências na literatura que apontam para a disfunção mitocondrial como um dos principais mecanismos fisiopatológicos da disfunção celular global e, conseqüentemente, da disfunção orgânica generalizada (Fink e Evans, 2002). As EROs/ERNs têm papéis claramente identificados na modulação da sinalização celular, apoptose e necrose, ao destruírem proteínas, polissacarídeos e ácidos nucléicos, induzindo disfunção mitocondrial e dano celular global (Lovat e Preiser, 2003). Adicionalmente, a produção aumentada de NO na célula, bem como no interior da mitocôndria, que ocorre durante o quadro séptico (Vincent *et al.*, 2000), traz como consequência a produção de mais radicais livres (RL) como o Peroxinitrito (ONOO⁻) (Boveris *et al.*, 2002), que provoca mais danos à cadeia transportadora de elétrons (Pearce *et al.*, 2001). Por sua vez, este dano adicional irá

produzir um número bem maior que o habitual do RL superóxido (O_2^-) (Guidot *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2002). O resultado final é a disfunção mitocondrial irreversível e os danos celulares e teciduais a ela associados (Brealey *et al.*, 2002).

Os antioxidantes enzimáticos presentes no corpo incluem glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) que funcionam como primeira linha de defesa do corpo contra EROs e RLs, catalisando a sua conversão em espécies menos reativas ou inertes (Mates *et al.*, 2000). Se os antioxidantes intracelulares GPx, SOD e CAT não forem capazes de agir perfeitamente no paciente durante as condições críticas de saúde, podem causar danos celulares e teciduais e podem acelerar as disfunções orgânicas. Assim, a atividade coordenada das enzimas antioxidantes, como GPx, SOD e CAT, no interior do ambiente celular, é de suma importância na proteção celular e tecidual. A atividade da superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) é, em especial, fundamental para a manutenção das funções intra-mitocondriais (Williams *et al.*, 1998). O pleno equilíbrio entre a atividade coordenada das EAOs tem um grande potencial terapêutico para qualquer paciente, e pode definir o desfecho daquele paciente em estado crítico de saúde (Salvemini e Cuzzocrea, 2003). Porém, mais frequentemente, durante a condição crítica de saúde, assim como durante o quadro séptico, este balanço está desregulado, e o dano mitocondrial passa a ocorrer desencadeando os danos celulares, teciduais e orgânicos subsequentes (Gellerich *et al.*, 2002; Brealey e Singer, 2003).

O estresse oxidativo que caracteriza o paciente crítico pode ser definido como a situação em que ocorre um aumento dos níveis fisiológicos de espécies reativas, resultante da alta produção de EROs associado, ou não, com a diminuição dos níveis de defesa de antioxidantes (Hargraves *et al.*, 2005). O aumento da geração de RLs e de danos subsequentes observado nos pacientes criticamente doentes tem sido associado a maiores taxas de morbidade e de mortalidade (Roth *et al.*, 2004).

EROs/ERNs também têm sido relatadas como desencadeadoras da liberação de citocinas a partir de células imunitárias, de ativar as cascatas inflamatórias e de aumentar a expressão de moléculas de adesão (Grimble, 1994). A inflamação e o tecido lesado resultam em um acúmulo de granulócitos nos órgãos, levando a uma maior geração de EROs cíclica, que ainda perpetua ou aumenta a resposta inflamatória e resulta em uma lesão tecidual gradual (Hammerman, 1998). As células endoteliais são estimuladas a

aumentar a permeabilidade vascular, causando extravasamento capilar. Os neutrófilos e macrófagos são quimicamente atraídos para áreas de peroxidação lipídica, fazendo com que estes fagócitos migrem para os tecidos e liberem mais EROs (Espat, 2000). Ambas as citocinas e EROs podem entrar na circulação e mediar muitas respostas inflamatórias sistêmicas ligadas a condições clínicas (Espat, 2000). Fontes de estresse oxidativo durante a doença crítica incluem a ativação de células fagocíticas do sistema imunitário, a produção de óxido nítrico pelo endotélio vascular, a liberação de íons de ferro e de cobre e metaloproteínas, assim como a isquemia/dano tecidual induzida por reperfusão. Quando o corpo está sobrecarregado pelo aumento da produção de agentes oxidantes e a defesa contra estes agentes é diminuída, o dano resultante contribui para distúrbios celulares, lesão celular e morte. Todas estas alterações patológicas são observadas durante a doença crítica (Gutteridge, 1999), assim, pelo fato do estresse oxidativo estar associado à gravidade da doença, o cuidado dos pacientes em estado crítico dependeria também de prevenir e controlar a produção de EROs.

Um controlado mecanismo de defesa antioxidante é especialmente necessário para combater a geração de EROs. Geralmente, sob condições fisiológicas normais, o equilíbrio entre a produção e a eliminação de EROs é mantido pelos componentes de defesa antioxidante. Mas, o sistema de defesa antioxidante do organismo torna-se sobrecarregado em pacientes que têm doenças graves. A quantidade de oxidantes aumenta drasticamente com a diminuição no fluxo sanguíneo do tecido e com a indução de resposta imune. Em pacientes criticamente doentes há pouca quantidade armazenada de antioxidantes, de plasma ou de concentração intracelular de captadores de elétrons livres ou cofatores, e diminuída atividade dos sistemas enzimáticos envolvidos na desintoxicação de EROs (Metnitz *et al.*, 1999; Therond *et al.*, 2000). O balanço de pró-oxidante/antioxidante é de relevância funcional durante a doença crítica, pois uma vez desregulado, interfere na patogênese da falência de múltiplos órgãos (Motoyama *et al.*, 2003). Quanto mais grave for a agressão do estado de doença, maior será o desbalanço pró-oxidante/antioxidante e maior é a depleção dos antioxidantes (Alonso de Vega *et al.*, 2002; Motoyama *et al.*, 2003). De fato, o baixo armazenamento de antioxidantes endógenos está associado a um aumento na produção de RLs, aumento da resposta inflamatória sistêmica, lesão celular subsequente, e aumento da morbidade e mortalidade no paciente criticamente doente (Goode *et al.*, 1995; Quasim *et al.*, 2003).

GLUTATIONA PEROXIDASE 1 (GPx1) E O POLIMORFISMO 593C>T NO GENE GPx1

A GPx é um eliminador endógeno e está envolvida no transporte de aminoácidos glutamyl através das membranas celulares e na degradação de proteínas (Novak *et al.*, 2002). Pertence a uma família de enzimas antioxidantes que catalisam a redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos (H₂O₂) pela glutaciona reduzida (GSH) para formar glutaciona oxidada (GSSG) e água (ou álcoois) (Yu, 1994). Para a redução dos peróxidos, estas enzimas utilizam o grupamento sulfidril da glutaciona reduzida, que pode ser reciclado pela interação da forma oxidada com NADPH através da enzima glutaciona redutase. Os grupamentos sulfidril doam dois hidrogênios, formando uma ligação dissulfeto, que pode transformar a molécula de peróxido em um álcool (R-OH) ou, no caso do peróxido de hidrogênio, em água (Halliwell e Gutteridge, 1999). Nas células, cerca de dois terços de sua atividade encontram-se no citoplasma e um terço, nas mitocôndrias. Foi observado que em pacientes criticamente doentes, a produção de EROs combinado com deficiência GPx contribui significativamente para a mortalidade (Fuhrman *et al.*, 1999). A doença crítica está associada com a diminuição das concentrações de GPx musculares e com a diminuição na relação da glutaciona total/reduzida, evidenciando o estresse oxidativo. Baixas concentrações de GPx podem reduzir a defesa muscular contra as EROs e comprometer a síntese de proteínas, influenciando negativamente o transporte de aminoácidos (Hammarqvist *et al.*, 1997). Oito tipos distintos de GPx (GPx-8) foram identificados em células humanas (Black, 1987).

A enzima GPx1 pertencente a classe de oxirredutases (Toppo *et al.*, 2009), e o gene humano que codifica a Glutaciona peroxidase 1 está localizado no braço curto do cromossomo 3, na região 3p21.3., sendo polimórfico (Sureda *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005). Foi verificado que as variantes polimórficas do gene *GPx1* podem afetar condições inflamatórias (Hamanishi *et al.*, 2004). Os polimorfismos são largamente distribuídos dentro das regiões codificantes e não codificantes do gene *GPx1* como registrado no banco de dados OMIM (ID: 138320) e de registros dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP). A variante mais conhecida dentro da região de codificação é o polimorfismo 593C>T (rs1050450, que gera alteração

proteica Pro198Leu) (Suzen *et al.*, 2009), cujos alelos geram alterações na atividade da enzima, resultando em mudanças no seu funcionamento (Bastaki *et al.*, 2006).

O polimorfismo 593C>T (rs1050450; Pro198Leu) trata-se de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP; *Single Nucleotide Polymorphism*), em que ocorre a troca de uma citosina (alelo 593C) por uma timina (alelo 593T) na posição do nucleotídeo 593 do gene *GPx1*. Esta mudança de nucleotídeo C>T altera o códon 198 da proteína GPx1, resultando na incorporação de uma prolina (variante Pro198; codificada pelo códon CCC) no lugar do resíduo leucina (variante Leu198; codificada pelo códon CTC). Esta mudança altera a conformação estrutural da enzima, comprometendo a eficiência do seu funcionamento: dados experimentais indicam que a conformação 198Leu traz uma menor atividade da enzima (Hu *et al.*, 2003).

Estudo anteriores com o SNP 593C>T no gene *GPx1* mostraram que portadores do alelo 593T possuem maior risco de câncer colorretal (Gurbuzier *et al.*, 2012), tonsilites (Zhao *et al.*, 2012), glioma (Ramprasath *et al.*, 2012), diabetes e doença cardiovascular (Hansen, 2009) e depressão (Johnson Phillips *et al.*, 2013). Outros estudos mostraram que pacientes com genótipo *GPx1* 593TT possuem altas taxas de doença arterial coronárias (Zheikova *et al.*, 2012), câncer de próstata (Kucukgergin *et al.*, 2011), câncer de bexiga (Kucukgergin *et al.*, 2012), câncer de pulmão (Ratnasinghe *et al.*, 2000), e hepatite C com cirrose (Nahon *et al.*, 2012) quando comparados com 593CC *GPx1* homozigotos, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Estudos recentes com o polimorfismo *GPx1* 593C>T em diferentes condições.

| Autor | Origem | N | Risco para a Condição | Associação com alelo 593T <i>GPx1</i> |
|----------------------------------|---------------|----------|---------------------------------|--|
| Ratnasinghe <i>et al.</i> , 2000 | Européia | 315 | Câncer de pulmão | S |
| Hansen <i>et al.</i> , 2009 | Européia | 1154 | Câncer colorretal | Ns |
| Jablonska 2009 | Européia | 405 | Aumento de selênio no plasma | S |
| Kucukgergin <i>et al.</i> , 2011 | Euro-asiática | 293 | Câncer de próstata | S |
| Gurbuzier <i>et al.</i> , 2012 | Euro-asiática | 314 | Tonsilite; hipertrofia tonsilar | Ns |
| Kucukgergin <i>et al.</i> , 2012 | Euro-asiática | 381 | Câncer de bexiga | S |
| Nahon <i>et al.</i> , 2012 | Européia | 200 | Hepatite C com cirrose | Ns |
| Ramprasath <i>et al.</i> , 2012 | Asiática | 824 | Doença cardiovascular diabética | S |
| Zhao <i>et al.</i> , 2012 | Asiática | 768 | Glioma | S |
| Zheikova <i>et al.</i> , 2012 | Européia | 210 | Doença arterial coronária | S |
| Johnson <i>et al.</i> , 2013 | Americana | 585 | Depressão | S |

N: número de casos + controles; S: Significante; Ns: Não significante.

Em uma revisão dos últimos 15 anos não há estudos diretamente relacionados com GPx/GPx1 e sepse, ou paciente crítico, porém Gärtner (1999), Batra (2000), Zang (2007), Forceville (2009) e Valenta (2011) envolvem o gene *GPx1* associado a sepse de forma complementar em seus estudos. Já na população brasileira, não há estudos. Nos últimos 15 anos, as populações onde foi estudado o polimorfismo 593C>T *GPx1* são primariamente asiáticas ou europeias.

SUPERÓXIDO DISMUTASE DEPENDENTE DE MANGANÊS (MnSOD) E O POLIMORFISMO 47 C>T NO GENE *SOD2*

Superóxido dismutase (SOD) é uma família de metaloproteínas onipresentes que catalisam a reação de dois ânions de superóxido (O_2^-) com a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2) (Nordberg e Arnér, 2001). Três tipos distintos de SODs foram identificados em células humanas.

A enzima antioxidante superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) é codificada por um gene nuclear (*SOD2*) e é encontrada na sua forma ativa na matriz mitocondrial (Weisiger e Fridovich, 1973). A proteína possui 222 aminoácidos (Beck *et al.*, 1987), sendo que os 24 primeiros aminoácidos pertencem a região do peptídeo sinal (Ho e Crapo, 1988) e, após ser sintetizada no citosol, é postranscricionalmente modificada para ser transportada à mitocôndria (Wispe *et al.*, 1989). Trabalhos com ratos *knockout* para a MnSOD mostraram que esta isoforma é essencial para a vida (Li *et al.*, 1995; Lebovitz *et al.*, 1996), e hipotetizam que uma regulação intrínseca da MnSOD age sobre as outras enzimas antioxidantes (Van Remmen *et al.*, 1999).

O gene humano que codifica a MnSOD está localizado no braço longo do cromossomo 6 (6q25) (Church *et al.*, 1992), possuindo cinco éxons e quatro íntrons (Wan *et al.*, 1994). Foram localizados seis sítios polimórficos (St. Clair, 2004): três na região promotora (-102; -93; -38) (Xu *et al.*, 1999); um no éxon 2 (Ala-9Val) (Rosenblum *et al.*, 1996); e dois no éxon 3 (I58/T; L60/F) (Borgstahl *et al.*, 1996; Hernandez-Saavedra e McCord, 2003).

O Polimorfismo Ala-9Val trata-se de um SNP no interior do gene *SOD2* em que ocorre a troca de uma citosina (alelo 47C) por uma timina (alelo 47T) na posição do nucleotídeo 47 do gene *SOD2*. Esta mudança de nucleotídeo 47C>T altera o resíduo 16 do peptídeo que dá origem à proteína MnSOD e, a depender do alelo codificador, resulta na incorporação de uma alanina (variante Ala-9; codificada pelo códon GCT) ou uma valina (variante Val-9; codificada pelo códon GTT) na região do peptídeo sinal que leva a MnSOD a atuar no interior da mitocôndria (Rosenblum *et al.*, 1996). Este polimorfismo altera a conformação estrutural da enzima MnSOD, o alelo que codifica para alanina (Ala-9) possibilita uma estrutura conformacional de α -hélice, já o alelo que codifica para valina (Val-9) possibilita uma estrutura conformacional β -folha comprometendo a eficiência no transporte para a mitocôndria (ou seja, Ala-9 pode ser mais facilmente transportado para a mitocôndria quando comparado com Val-9) (Shimoda-Matsubayashi *et al.*, 1996; Shimoda-Matsubayashi *et al.*, 1997). Dados experimentais indicam que a conformação Ala-9 traz uma maior atividade, devido a seu melhor transporte para a mitocôndria (Hiroi *et al.*, 1999), e que esse dimorfismo além de controlar a importação também regula a estabilidade do mRNA da MnSOD (Sutton *et al.*, 2005).

Paludo *et al.* (2013) encontraram uma maior frequência significativa de choque séptico em pacientes de UTI sépticas com o alelo 47C do gene da *SOD2*. A maior frequência do alelo 47C em pacientes sépticos com resultado negativo encontrados por Paludo *et al.* (2013) poderia ser explicado por efeitos da maior atividade de MnSOD no estresse celular durante a sepse.

MEDICINA GENÔMICA - PACIENTE CRÍTICO E GENES *GPx1* E *SOD2*

A Medicina Genômica possui um grande potencial na medicina preditiva e preventiva, através do estudo de variantes genéticas polimórficas associadas com o risco de diferentes doenças. Nos dias de hoje existem laboratórios clínicos que oferecem o estudo de mais de 30 mil variantes associadas com a suscetibilidade, são de fácil acesso aos indivíduos e sem necessidade de uma ordem médica. Esses testes permitem realizar um plano específico de medicina preventiva (Briceno Balcazar, 2011). Nos cerca de 20 mil genes do genoma humano (Wright *et al.*, 2001) codificadores de mais de 100 mil proteínas, já foram

detectadas centenas de milhares de alterações (mutações e polimorfismos) (Collins *et al.*, 2003), as quais podem ser relacionadas às suscetibilidades à doença crítica (Holmes *et al.*, 2003), ou seja, genes variantes cuja expressão favorece ou não a manifestação de um fenótipo, e no caso do paciente crítico, ao seu desfecho.

Como citado anteriormente, durante a doença crítica e nos casos mais graves de infecção (SIRS, sepse, ou choque séptico) as condições fisiológicas estão associados com depleção grave de antioxidantes (Alonso de Veja *et al.*, 2002; Motoyama *et al.*, 2003; Berger *et al.*, 2007), e este cenário aumenta o risco de mortalidade do paciente internado na UTI. No entanto, mesmo sem disfunções orgânicas significativamente diferentes, ou sem infecção grave (sepse ou choque séptico), alguns pacientes de UTI também evoluem para a mortalidade. Isto poderia ser explicado, pelo menos em parte, pela herança genética de cada indivíduo, uma vez que alguns genes têm variantes polimórficas que impedem o organismo a reverter deste estado crítico levando a evolução do paciente a um desfecho pior.

Os estudos genéticos no paciente crítico poderiam contribuir para a compreensão da complexidade do estresse oxidativo humano, e revelar uma abordagem direcionada para o conhecimento dos mecanismos moleculares e celulares que desencadeiam tais variações fisiopatológicas. Este conhecimento básico poderia conduzir para o conhecimento e para a modulação da sequência de eventos que culmina nos desfechos desfavoráveis, permitindo avaliar como o organismo responde a situações extrema, como condições de cuidados crítico. Conhecer as bases genéticas de tais eventos é, portanto, fundamental.

Nos últimos anos nosso grupo realizou um levantamento de mais de uma dezena de genes candidatos a interferir no desfecho do paciente crítico. Nosso grupo observou que: (I) a herança de -260TT do gene CD14 está significativamente associada à mortalidade em pacientes críticos (D'Avila *et al.*, 2006); (II) homocigotos -260TT do CD14 têm níveis elevados de mCD14, e níveis de mCD14 e sCD14 são significativamente mais altos em pacientes sépticos do que em controles (Butkus de Aguiar *et al.*, 2010); (III) uma amostra de 532 pacientes críticos (203 com sepse e 143 com choque séptico) não apresentava as variantes mutantes 2029C>T e 2258G>A do gene TLR2 (Thurrow *et al.*, 2010); (IV) o alelo mutante -308A do gene TNF-alfa não interfere no desfecho de choque de pacientes sépticos (Paskulin *et al.*, 2011); (V) ECA sem associação com evolução e desfecho renal (Pedroso *et al.*, 2010); (VI) frequência significativamente

maior de choque em pacientes sépticos com o alelo 47C SOD2 (Paludo *et al.*, 2013); (VII) sinergia entre -260TT CD14 e -308GG TNFa influenciam significativamente a mortalidade (Fallavena *et al.*, 2013); (VIII) homozigoto 896TT eNOS está significativamente associado à disfunção do CVS (Fraga *et al.*, 2013); (IX) haplótipo IG HLA-G evolui significativa e mais frequentemente para choque séptico (Graebin *et al.*, 2012). Considerando que os alelos da GPx podem promover maior desbalanço oxidativo, pensamos que poderíamos contribuir neste conhecimento estudando o SNP 593C>T do gene *GPx1* em nosso banco de amostras.

Como hipótese, sugerimos que as variantes da GPx podem ter efeitos diferentes durante a doença crítica e influenciar o desfecho do paciente. Ainda mais, conjuntamente com variantes reconhecidamente alteradas da SOD, como é o caso do alelo 47C, supomos que pode haver um efeito cumulativo de desbalanço oxidativo celular o que pode contribuir para desfechos alterados no paciente crítico.

2- OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar variantes polimórficas do gene *GPx1* em pacientes criticamente doentes com a finalidade de buscar relações entre a herança genética e o curso clínico dos pacientes. Buscamos investigar se variantes polimórficas do gene *GPx1* poderiam influenciar a suscetibilidade à sepse, ao choque séptico, às disfunções orgânicas e/ou à mortalidade de pacientes críticos.

CAPÍTULO 2

Artigo previsto a ser submetido à revista *Human Pathology*.

Effect of 593C>T *GPx1* SNP alone and in synergy with 47C>T *SOD2* SNP on the outcome of critically ill patients.

Fernanda Majolo^a, Francis Jackson de Oliveira Paludo^b, Aline Ponzoni^a, Pietra Graebin^a, Fernando Suparregui Dias^c, Clarice Sampaio Alho^a

^a Molecular and Human Genetic Laboratory. Biosciences School, Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

^b Department of Biochemistry, Institute of Basic Health Sciences (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS)

^c Intensive Care Unit of Sao Lucas Hospital, Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Keywords: Critical illness; *GPx1*; ICU; sepsis; septic shock; *SOD2*

Running head: 593C>T *GPx1* and 47C>T *SOD2* SNPs on the ICU patients' outcome

Conflict of interest: There is no conflict of interest.

INTRODUCTION

Patients admitted to the Intensive Care Unit (ICU) are described as presenting with a critical and complex pathological condition resulting from severe physiological weakness [1]. Infections and inflammatory processes prolong the length of stay of these patients in the unit and increase their organ dysfunction and mortality rates [2]. Critical illness is characterized by oxidative stress, which is a major promoter of systemic inflammation and organ failure due to excessive free radical production, depletion of antioxidant defenses, or both [3]. In oxidative stress, the level of toxic reactive oxygen intermediates overcome the endogenous antioxidant defenses of the host and damage biologically relevant molecules, such as DNA, RNA, proteins, carbohydrates, and unsaturated fatty acids of the cell membranes [4, 5, 6, 7]. Oxidative stress may not be considered an epiphenomenon in the critically ill patient but part of the underlying pathophysiologic events leading to mitochondrial dysfunction and systemic inflammatory response syndrome (SIRS), sepsis, and septic shock, which can lead to multiple organ dysfunction syndrome (MODS) [8] and death. During critical illness, the most severe cases of infection (SIRS, sepsis, or septic shock) are associated with the most severe antioxidant depletion [9, 10, 11], and this scenario raises the ICU patient's mortality risk. However, even without organ dysfunctions or severe infection (sepsis or septic shock) some ICU patients can have a positive outcome. It can be explained, at least in part, by the individual's genetic constitution, since some genes have polymorphic variants that help the body recover from this critical condition. Otherwise, some genetic variants may predispose the patient to a worse outcome.

Paludo *et al.* (2013) showed a significant higher frequency of septic shock in septic ICU patients with the 47C allele of the manganese superoxide dismutase gene (*SOD2*, locus 6q25) [12]. The single nucleotide polymorphism (SNP) on *SOD2* gene (47C>T; rs4880; Ala-9Val signal peptide mutation on MnSOD) synthesizes a manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD, EC 1.15.1.1) with different activities; the alanine version of MnSOD (codified by the 47C allele) is predicted to lead to higher mitochondrial MnSOD activity than the valine (codified by the 47T allele) isoform [13]. The higher 47C allele frequency in septic patients with negative outcome found by Paludo *et al.* [12] could be explained by effects of higher

MnSOD activity on cellular stress during sepsis. The human antioxidant endogenous defense system consists of a variety of extracellular and intracellular antioxidants that are able to protect cells and tissues from reactive oxygen species (ROS) [7]. The balance of antioxidant enzymes activity such as SOD, catalase, or glutathione peroxidase (GPx) is, therefore, crucial. The defense mechanism against damage by ROS, SOD plus GPx or catalase eliminates many damaging oxygen species; SOD catalyzes the dismutation of superoxide anion (O_2^-) into hydrogen peroxide (H_2O_2) plus O_2 [14]. However, the damage caused by H_2O_2 can be removed by GPx1 which uses glutathione (GSH) as the reducing agent, or by catalase; both glutathione peroxidases and catalase convert H_2O_2 to $O_2 + H_2O$ [15]. When intracellular antioxidants such as SOD and GPx1 are not able to act perfectly in ICU patients during critical condition, cellular/tissue damage may be higher and the overall patient outcome may be worse.

Since 1957, GPx1 is known as an erythrocyte enzyme that protects hemoglobin from oxidative injury [16]. It is part of the enzymatic antioxidant defense preventing oxidative damage to DNA, proteins and lipids by detoxifying hydrogen and lipid peroxides. *GPx1* is expressed in almost all tissues, and also is abundant in organs such as kidney and liver [17]. A SNP in the *GPx1* gene (593C>T; rs1050450; Pro198Leu protein mutation on the GPx1 enzyme) has the 593T allele and the 593TT genotype associated with different diseases (Table 1). This SNP alters the conformation of the GPx1 enzyme, changing its efficiency; the protein codified by 593T allele has lower enzyme activity when compared to GPx1 codified by 593C allele [18].

In this study, it was genotyped the 593C>T *GPx1* SNP in 626 ICU patients and further analysis were conducted regarding patient's organ dysfunctions, sepsis, septic shock, and mortality rates. It was also considered the previous 47C>T *SOD2* SNP genotyping of these critically ill patients to evaluate their outcome.

MATERIALS AND METHODS

Design, subjects, and approval: In this study we included a total of 626 critically ill adult patients from the general intensive care unit (ICU) of São Lucas Hospital, Porto Alegre, RS, Brazil, admitted between March 1st, 2002 and November 31st, 2006. Part of these patients has been described by Fallavena *et al.* [19] and Fraga *et al.* [20]. Patients were not eligible if they were diagnosed with HIV-infection or a known immunodeficiency, taking immunosuppressive drugs, pregnant or lactating. All subjects were from southern Brazil, which is composed by a singular genetic background: the majority of subjects are of European origin (Portuguese, Italians, Spanish, and Germans ancestry), and there is a small number of individuals with African traits contributing to their genetic pool [21]. We assumed that the environmental exposure has a crucial influence, this being the reason why healthy subjects were not used as a control group. As a result, we performed comparison among ICU patients only. The study has been approved by the Research Ethics Committee of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul and the informed written consent or assent to participate in the research was obtained from all subjects or patients' surrogates (CAAE 18473713.6.0000.5336; Process # 330.285).

Phenotyping: Patients admitted to the ICU were diagnosed with sepsis, severe sepsis and septic shock according to the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Consensus Conference definition [22]. SIRS (systemic inflammatory response syndrome) was defined by the presence of at least two of the following symptoms: fever or hypothermia (core temperature $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$ or $\leq 36\text{ }^{\circ}\text{C}$); tachycardia (>90 beats/min); tachypnea or hyperventilation (breaths/min >20 or $\text{PaCO}_2 \leq 32$ mm Hg); leukocytosis (>12.000 mm³) or leucopenia (≤ 4.000 mm³). Sepsis was defined as SIRS secondary to infection, severe sepsis were sepsis complicated by organ dysfunction and, septic shock if refractory arterial hypotension to fluid replacement, needing vasopressors. For illness severity evaluation we used the APACHE-II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II) score [23] obtained on ICU admission day. Organ dysfunction evaluation was performed according to SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) [24] (Vincent *et al.*, 1998) score obtained on ICU admission day (SOFA-1), on a daily basis during the first week of ICU admission (SOFA-2 to SOFA-7) and on days 15 (SOFA-15) and 29 (SOFA-29) for patients that stayed in the ICU.

Temporal variation comprised length of stay (LOS) in ICU and hospital stay. Mortality was measured in days until death in total hospital stay: clinical endpoints of the study were discharge from the hospital (considered survivors), or death (considered non-survivors). For those patients with multiple ICU admission during the study period, only data from the first entrance were considered. All clinical data were collected and verified by ICU physicians with control ensure.

Genotyping: Genomic DNA was extracted from leucocytes by a standard method [25]. The genotyping protocol for the determination of 593C>T *GPx1* SNP was as follows: Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed at a total volume of 25 μ L with about 10–100 ng of genomic DNA, 2.5 μ L Taq DNA Polymerase in Taq Buffer (Life Technologies — Brazil Ltda. INVITROGEN Inv. São Paulo, SP, Brazil), final concentration of each dNTP 0.2 mM, and 2 mM MgCl₂. The segment of the *GPx1* gene was amplified using primers sense 5'-TGT GCC CCT ACG CAG GT-3', and anti-sense 5'-CCA AAT GAC AAT GAC ACA GG-3' (Life Technologies Ltda, Brazil. INVITROGEN Inv. São Paulo, SP, Brazil). PCR was performed on Veriti thermocycler from Applied Biosystems as follows: initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 95 °C for 40 s, 59 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min and 30 s. The final extension step was prolonged to 10 min. The 338 bp amplification product was quantified (10-50 ng/ μ l) by Low Mass (Invitogen-Life Technologies, São Paulo, Brazil) in 1% agarose gel. PCR products were directly sequenced using the same primer sequences in the ABI 3730 XL DNA Sequencer according to the manufacturer's manual. Genotyping was performed by interpretation of chromatogram peaks by sequencing FinchTV software version 1.4.0. We also performed a second independent PCR restriction fragment length-polymorphism analysis in order to confirm some genotypes; the 338 bp PCR amplified product was cleaved in appropriated buffer with 100U of Apa I (GibcoBRL®-Life Technologies™, Rockville, MD, USA) at a total volume of 15 μ L at 37 °C for 8 h. We used a quality control system to ensure genotyping accuracy: sequencing verification of the DNA amplified fragment, black controls, and duplicates.

Statistical analysis: Statistical calculations were performed using the statistical package SPSS 13 (SPSS 13.0 for Windows, Chicago, Illinois, USA). Unless otherwise stated, continuous variable results are expressed as a mean and standard deviation (SD), and categorical variables as frequencies and percentage. Means were compared using one-way analysis of variance, and non-normally distributed variables were

analyzed as non-parametric using Mann–Whitney test. For the categorical data we used Pearson chi-square test, also used to test for Hardy-Weinberg equilibrium.

RESULTS

We obtained data of the first day to a maximum of 224 days from 626 patients admitted to the ICU. Table 2 describes patient profile grouped according to 593C>T *GPx1* SNP: patients with 593TT genotype (N = 94; 15%) and without 593TT genotype (N = 532; 85%). The general genotypic and allelic frequencies in ICU patients sample (N = 626) did not differ from the values expected by the Hardy–Weinberg model (P = 0.654). Through the analysis of different variables (organ dysfunction, sepsis, and septic shock) among all critically ill patients no significant difference between the two groups were observed, except in relation to the mortality rate. The rate of ICU mortality was significantly higher in the group of individuals with 593TT genotype than in the group of individuals with 593CT or 593CC genotypes (52% *versus* 38%, P = 0.009; OR = 1.79; 95% CI = 1.13-2.85) (Table 2). Analyzing the rates of mortality in the hospital (ICU period plus period in the hospital after ICU discharge), the mortality rate remained significantly higher in the group of individuals with 593TT genotype than in the group with individuals with 593CT or 593CC genotypes (61% *versus* 49%, P = 0.037). When analyzing the different variables only among septic patients (N = 463) or only among patients with septic shock (N = 327) we observed no significant difference between the two genotypes.

In a previous study Paludo *et al.* [12] detected an important contribution of the 47C allele of 47C> T *SOD2* SNP on septic shock outcome in ICU septic patients. In their study with 356 septic ICU patients, there was a significant higher frequency of septic shock in septic subjects with the 47C allele of the *SOD2* gene. They compared the 47C allele carriers (47CC+47CT genotypes; N = 252) with 47TT homozygotes (N = 104) and noticed a significant association between 47C allele carriers and septic shock in septic patients (78% *versus* 66%; P = 0.025; OR = 1.78; 95% CI = 1.04-3.03). The authors suggested the higher 47C allele frequency in septic patients with negative outcome could be explained by effects of higher activity of MnSOD on cellular stress during sepsis. Thus, using a total sample of 446 ICU subjects with DNA profile to both *SOD2* and *GPx1* genes, we conducted an analysis, the same previous, including the two genotypes. We

considered the patients with 593T *GPx1* and 47C *SOD2* alleles (N = 198) versus the patients with other genotypes setting (N = 248). The result showed that it was not possible to detect a statistically significant difference between the two groups of critically ill patients in any of the variables (sex, age, SOFA and APACHE-II scores, sepsis, septic shock, or mortality). To explore all data, we performed more tests with different approaches using diverse double genotype combination sets, but any important result has been found. When studying the subgroup of septic subjects with double genotype DNA profile of both *SOD2* and *GPx1* genes (N = 296), we observed no differences in the mortality rates in sex, age, or SOFA and APACHE-II scores; however there was a significant higher frequency of septic shock in septic patients with 593T *GPx1* and 47C *SOD2* alleles (N = 122) when compared to septic patients with other settings of genotypes (N = 174) (78% versus 66%; P = 0.028; OR = 1.81; 95% CI = 1.03-3.18). This combined analyses confirmed the association found by Paludo *et al.* and also demonstrated an important synergistic relationship between these two oxidative stress-related genes on the phenotype. This synergy between *GPX1* and *SOD2* gene is recognized, but here we are demonstrating a synergy between 593C>T *GPX1* and 47 C>T *SOD2* SNP acting on septic patients. We believe this last result demonstrates a simultaneous effect of *GPx1* and *SOD2* gene variation inheritance on the outcome from sepsis.

DISCUSSION

Genetic studies are important to understand the complexity of human oxidative stress, and how the organism responds to an extreme situation such as critically care conditions. Glutathione peroxidase (GPx) is one of the first endogenous antioxidant defense enzymes, and it works cooperatively to detoxify free radicals from the cellular environment. Previous studies with this *GPx1* SNP (593C>T; rs1050450; Pro198Leu) showed that 593T carriers had higher risk to colorectal cancer [26], tonsillitis [27], glioma [28], diabetic and cardiovascular disease [29] and depression [30]. Other studies noticed that patients with 593TT *GPx1* genotype had higher rates of coronary artery disease [31], prostate cancer [32], bladder cancer [33], lung cancer [34], and hepatitis C with cirrhosis [35] when compared to 593CC *GPx1* homozygotes. Our

study revealed a new significant association of 593TT *GPx1* genotype in critically ill subjects with adverse outcome (mortality) when compared to 593CT + 593CC *GPx1* subjects. It seems that the 593TT *GPx1* patient group was more susceptible during the critical state, evolving to worse conditions of health and presenting a higher mortality rate. However it is not so simple to explain the real causes of this relation because complex conditions in ICU patients are caused by many physiological, biochemical, and other intrinsic (genetic) factors, and each factor alone has somewhat of an effect.

To search for candidate genetic markers to understand a complex condition is a hard task since many genes interfere in a net of intrinsic and extrinsic factors. It may be a challenge to detect the single effect of each gene or each gene variation in this net. Even though we were able to detect a striking association of a single variant in the *GPx1* gene since it was strong enough to appear as a statistically significant factor in the ICU patients' outcome. Based on our results, we believe the 593TT *GPx1* genotype could be associated, even if not directly, with a higher propensity of unbalanced cell oxidative control, thus leading us to suggest the 593C>T *GPx1* SNP, in its genomic context, as a candidate marker to help understand the differential susceptibility to oxidative imbalance of the critically ill patient.

The human's antioxidant endogenous defense system consists of a variety of extracellular and intracellular antioxidants that are able to protect tissues from reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) induced injury [7]. SOD, catalase and GPx enzymes need to be well coordinate expression and activities in the whole scenario. These antioxidants require trace elements, such as copper, manganese, zinc, iron, and selenium are for their full activity [36]. Selenium, for example, is an essential component of the intracellular antioxidant system as a structural component of the active center of glutathione peroxidase enzymes. Selenium enzymes play a major role in protecting cells against peroxidation, especially lipid peroxidation. Furthermore, selenium seems to play a direct role in the regulation of inflammatory processes and its deficiency is directly correlated to the severity of the disease and the incidence of mortality [37]. Low levels of selenium or other endogenous vitamins and trace elements during the critical illness are also observed due to an escape to the interstitial compartment by capillary leakage, hemodilution, previous insufficient intake, and continuous renal replacement therapies [38]. This loss could explain why intracellular antioxidants such as GPx1 and SOD enzymes were not able to

act perfectly in ICU patients, given that the patient is in critical condition and has loss of elements and ions, even if the ICU patient does not present sepsis. Based on our results we were not able to conclude if 593C>T *GPx1* or 47C>T *SOD2* variants confer more or less susceptibility to fix or decrease the levels of elements and ions, we may only infer if they are influencing the patients' outcome.

During critical illness the most severe cases of infection, like sepsis, are associated to the most severe antioxidant depletion [9, 10, 11], and this scenario raises the ICU patient's mortality risk. As reported previously, both 593T and 47C variants change the levels and activities of GPx1 and SOD2 enzymes, respectively. GPx1 enzyme codified by 593T *GPx1* allele has lower enzyme activity than the GPx1 codified by 593C *GPx1* allele [18]; and the alanine version of MnSOD (codified by 47C *SOD2* allele) is predicted to lead to higher mitochondrial MnSOD activity than the valine (codified by 47T *SOD2* allele) isoform [13]. Thus, these genetic variants could lead the patient to a worse outcome, since intracellular antioxidants MnSOD and GPx1 are not able to act perfectly in ICU patients during critical condition and cellular/tissue damage may be higher.

Given that the ultimate levels of ROS depend on both dismutation of superoxide anion (O_2^-) into hydrogen peroxide (H_2O_2) by MnSOD and detoxification of H_2O_2 by GPx1, and that 593C>T *GPx1* and 47C>T *SOD2* SNPs influence the detoxification pathway of ROS, it is plausible hypothesize the combination of these two gene polymorphisms has a deeper effect on disease risk than a single gene polymorphism [33]. Cox *et al.* [39] exemplify this in a study that indicates no association between breast cancer and the two gene polymorphisms when examined independently. However, individuals carrying both 593TT *Gpx1* and 47CC *SOD2* genotypes had an increased risk of breast cancer when compared to individuals carrying both 593CC *Gpx1* and 47TT *SOD2* genotypes. In another study, Ichimura *et al.* [40] found that the combination of both 593TT *Gpx1* and 47CC *SOD2* genotypes conferred a highest risk for bladder cancer with an odds ratio of 2.69 (95% CI = 1.25–5.80; P = 0.011). Using the same methodology, Sutton *et al.* [41] showed in a prospective cohort study alcoholic cirrhotic patients with the high activity MnSOD version (47C *SOD2* allele) and the low activity GPx1 enzyme (593T *GPx1* allele) presented a higher incidence of hepatocellular carcinoma in cirrhosis during follow-up. The authors suggested that these genotypic associations could be explained by an increase of mitochondrial superoxide production by the high dismutation rate of 47T *SOD2*

variant and slow detoxification of hydrogen peroxide by the low activity of 593T *GPx1* variant [42,41]. All of these results suggest that these genetic variants may have a synergistic effect on the increase of disease risk.

The combined contribution of multiple genes and environmental factors affect the onset, the evolution and the outcome of complex diseases. Each gene, or gene variation, contributes with its particular small and cumulative effect to the final phenotype. In a combined analyses with both *GPx1* and *SOD2* genetic variants, despite of other variables, we identified a significant higher frequency of septic shock in a group of septic patients with both 593T *GPx1* and 47C *SOD2* alleles when compared to septic patients with other settings of genotypes (78% versus 66%; $P = 0.028$; OR = 1.81; 95% CI = 1.03-3.18). Combined analyses can be difficult to process because they need a very large sample size for comparisons and statistic power. However, even with the smaller sample size in this last analysis ($N = 296$), this result could be important to consider future advanced approaches. Combined genetic analysis with more than one SNP are especially interesting because it may demonstrate that the synergic effect of two gene variations could be stronger than single *GPx1* or *SOD2* SNP effects. In association studies, the combined detection of independently segregated SNPs may provide a deeper insight about simultaneously interaction of genes, and how it affects the phenotype.

Another important aspect to consider is epigenetic, that is the study of how molecules binding on DNA can produce significantly different phenotypes as a result of differing biochemical changes that alter gene availability for protein production [44, 45]. It can explain why exists differences in patient and population in susceptibility to illness, clinical course, and outcomes. Epigenetic mechanisms, as DNA methylation, can result in increased or decreased gene products. When gene expression is altered, the potential for significant phenotypical alterations to pathology, disease progression, and short- and long-term outcomes exists. Epigenetic regulation, in which gene expression is altered and may significantly impact critical illness outcomes, can occur through direct methylation of DNA cytosine bases resulting in downregulation of genes. Alternatively, demethylation might upregulate expression of genes.

Both 593 C>T *GPX1* and 47C>T *SOD2* SNPs has cytosine exchange, that may be affected by methylation. The prior epigenetic changes of somatic cells could thus have a direct effect on an individual's ability to respond to sepsis in the future [46].

Here, we worked with over 600 patients in critical conditions; we performed comparisons among ICU patients, and we did not use healthy subjects as control group to exclude the crucial influence of environmental exposure. Our study was able to demonstrate the effect of 593C>T *GPx1* and 47C>T *SOD2* SNPs on ICU patient outcome with statistical significance. Accepting the previously reported functional effects of these two SNPs on *GPx1* and *SOD2* gene expressions and, consequently, on GPx1 and MnSOD enzyme activities, we believe our results may be considered as an important contribution for the understanding of oxidative imbalance during the critical ill.

CONCLUSION

The present study provides statistically founded evidence that the 593C>T *GPx1* SNP alone or in synergic effect with 47C>T *SOD2* SNP is associated with the outcome of critically ill patients. The *GPx1* polymorphism and its genomic context can provide insights for understanding the oxidative stress since its genetic variants have been previously reported to result in changes in enzyme levels and activities.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed by Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (FAPERGS/MS/CNPq/SESRSEFP00000829).

REFERENCES

- [1] Vincent JL. Sepsis: The magnitude of the problem In. The Sepsis Text. Kluwer Academy Publisher, 2002.
- [2] Siqueira-Batista R, Gomes AP, Pessoa-Júnior VP. Sepsis, em: Rocha MOC, Pedroso ERP. Fundamentos em infectologia. 2009, Rio de Janeiro: Rubio; p.567-90.
- [3] Manzanares W, Dhaliwal R, Jiang X, Murch L, Heyland DK. Antioxidant micronutrients in the critically ill: a systematic review and meta-analysis. Crit Care 2012; 16(2).
- [4] Goodyear-Bruch C, Pierce JD. Oxidative stress in critically ill patients. Am J Crit Care 2002; 11:543-561.
- [5] Lovat R, Preiser JC. Antioxidant therapy in intensive care. Crit Care 2003; 9:266-70.
- [6] Victor VM, Rocha M, De la Fuente M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. Int Immunopharmacol 2004; 4:327-347.
- [7] Berger MM. Can oxidative damage be treated nutritionally? Clin Nutr 2005; 24:172-83.

- [8] Frost MT, Wang Q, Moncada S, Singer M. Hypoxia accelerates nitric oxid dependent inhibition of mitochondrial complex I in activated macrophages. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288:R394-R400.
- [9] Alonso de Vega JM, Díaz J, Serrano E, Carbonell LF. Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 2002; 30:1782-86.
- [10] Motoyama T, Okamoto K, Kukita I, Hamaguchi M, Kinoshita Y, Ogawa H. Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 2003; 31:1048-1052.
- [11] Berger MM, Chiólero R. Antioxidant supplementation in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 2007; 35: S584-S90.
- [12] Paludo FJO, Picanço JB, Fallavena PRV, Fraga LR, Graebin P, Nóbrega OT, Dias FS, Alho CS. Higher frequency of septic shock in septic patients with the 47C allele (rs4880) of the SOD2 gene. *Gene* 2013; 517(1):106-11.
- [13] Hiroi S, Harada H, Nishi H, Satoh M, Nagai R, Kimura A. Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261:332–339.
- [14] Williams MD, Van Remmen H, Conrad CC, Huang TT, Epstein CJ, Richardson A. Increased oxidative damage is correlated to altered mitochondrial function in heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mice. *J Biol Chem* 1998; 273(43):28510-15.
- [15] YU, BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Ver* 1994; 74:139-62.
- [16] Mills G C: Hemoglobin catabolism. I: Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 1957; 229:189–197.
- [17] Lei XG. Glutathione peroxidase-1 gene knockout on body antioxidant defense in mice. *Biofactors* 2001; 14:93-9.
- [18] Hu YJ, Diamond AM. Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. *Cancer Res* 2003; 63: 3347-51.
- [19] Fallavena PRV, Jesus BT de, Paskulin DD, Thurow HS, de Oliveira Paludo FJ, dos

- Santos Froes C, Graebin P, Dias FS, de Toledo NO, Alho CS. The Synergy of -260T T CD14 and -308GG TNF- α Genotypes in Survival of Critically Ill Patients. *Human immunology* 2012; 77: 62-8.
- [20] Fraga LR, Paludo FJO, Bós AJG, Ferraro JLS, Dias FS, Alho CS. More severe clinical course of cardiovascular dysfunction in intensive care unit patients with the 894TT eNOS genotype. *Genetics and Molecular Research* 2013; 12 (1):562-68.
- [21] Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100:177–82.
- [22] 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; 101: 1644–55.
- [23] Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit. Care Med* 1985; 13: 818–829.
- [24] Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F, Blecher S. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. *Crit Care Med* 1998; 26: 1793–1800.
- [25] Lahiri DK, Nurnberger JJI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 5444.
- [26] Hansen RD. GPx1 Pro(198)Leu polymorphism, erythrocyte GPx activity, interaction with alcohol consumption and smoking, and risk of colorectal cancer. *Mutat Res* 2009; 664(1-2):13-9.
- [27] Gurbuzier I, Sogut E, Koc S, Eyibilen A, Yelken K, Senkal Ha, Aksakal C. Manganese-superoxide dismutase and glutathione peroxidase 1 polymorphisms in recurrent tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2012; 76(9):1270-3.
- [28] Zhao P, Zhao L, Zou P, Lu A, Liu N, Yan W, Kang C, Fu Z, You Y, Jiang T. Genetic oxidative stress variants and glioma risk in a Chinese population: a hospital-based case–control study. *BMC Cancer* 2012; 12:617.

- [29] Ramprasath T, Murugan PS, Kalaiarasan E, Gomathi P, Rathinavel A, Selvam GS. Genetic association of Glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1(NQO1) variants and their association of CAD in patients with type-2 diabetes. *Mol Cell Biochem* 2012; 361(1-2):143-50.
- [30] Johnson Phillips JA, Mauer C, Edwards M, Balldin VH, Hall JR, Barber R, Tori L, Conger E, Sid EO. The impact of GPx1 on the association of groundwater selenium and depression: a project Frontier study. *BMC Psychiatry* 2013; 13:7.
- [31] Zheikova TV, Golubenko MV, Buikin SV, Botkina OY, Makeeva OA, Lezhnev AA, Kalyanov EV, Tsimbalyuk IV, Maksimov VN, Voevoda MI, Shipulin VM, Puzyrev VP. Glutathione peroxidase 1 (GPx1) single nucleotide polymorphism Pro198→Leu: Association with life span and coronary artery disease. *Molecular Biology* 2012; 46: 433- 37.
- [32] Kucukgergin C, Gokpınar M, Sanlı O, Tefik T, Oktar T, Seckin S. Association between genetic variants in glutathione peroxidase 1 (GPx1) gene, GPx activity and the risk of prostate cancer. *A Journal on Nephrology and Urology* 2011; 63(3):183-90.
- [33] Kucukgergin C, Isman FK, Cakmakoglu B, Sanlı O, Seckin S Association of polymorphisms in MCP-1, CCR2, and CCR5 genes with the risk and clinicopathological characteristics of prostate cancer. *DNA Cell Biol* 2012; 31(8):1418-24.
- [34] Ratnasinghe D, Tangrea JA, Andersen MR, Barrett MJ, Virtamo J, Taylor PR, Albanes D. Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Res* 2000; 60: 6381-83.
- [35] Nahon P, Sutton A, Rufat P, Charnaux N, Mansouri A, Moreau R, Ganne-Carrié N, Grando-Lemaire V, N'Kontchou G, TrincheT J. C, Pessayre D, Beaugrand M. A variant in myeloperoxidase promoter hastens the emergence of hepatocellular carcinoma in patients with HCV-related cirrhosis. *J Hepatol* 2012; 56(2):426-32.
- [36] Sfar S, Jawed A, Braham H, Amor S, Laporte, Kerkeni A. Zinc, copper and antioxidant enzyme activities in healthy elderly Tunisian subjects. *Experimental Gerontology* 2009; 44 (12) 812–17.
- [37] Gärtner R, Angstwurm M. Significance of selenium in intensive care medicine. *Clinical studies of patients with SIRS/sepsis syndrome. Med Klin* 1999; 94(3):54-7.

- [38] Berger MM. Antioxidant micronutrients in major trauma and burns: evidence and practice. *Nutr Clin Pract* 2006; 21:438-49.
- [39] Cox DG, Tamimi RM, Hunter DJ. Gene X Gene interaction between MnSOD and GPX-1 and breast cancer risk: a nested case-control study. *BMC Cancer* 2006; 6: 217.
- [40] Ichimura Y, Habuchi T, Tsuchiya N, Wang L, Oyama C, Sato K, Nishiyama H, Ogawa O, Kato T. Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. *J Urol* 2004; 172(2):728-32.
- [41] Sutton A, Nahon P, Pessayre D, Rufat P, Poiré A, Ziol M, Vidaud D, Barget N, Ganne-Carrié N, Charnaux N, Trinchet JC, Gattegno L, Beaugrand M. Genetic polymorphisms in antioxidant enzymes modulate hepatic iron accumulation and hepatocellular carcinoma development in patients with alcohol-induced cirrhosis. *Cancer Res* 2006; 66:2844–52.
- [42] Choi JY, Neuhauser ML, Barnett MJ, Hong CC, Kristal AR, Thornquist MD, King IB, Goodman GE, Ambrosone CB. Iron intake, oxidative stress-related genes (MnSOD and MPO) and prostate cancer risk in CARET cohort. *Carcinogenesis* 2008; 29:964–70.
- [43] Jablonska E, Gromadzinska J, Reszka E, Wasowicz W, Sobala W, Szeszenia-Dabrowska N, Boffetta P. Association between GPx1 Pro198Leu polymorphism, GPx1 activity and plasma selenium concentration in humans. *Eur J Nutr* 2009; 48:383.
- [44] Goldberg A D, Allis C D, Bernstein E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell* 2007; 128 (4): 635–638.
- [45] Tang W Y and Ho S. Epigenetic Reprogramming and Imprinting in origins of disease. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorder* 2007; 8(2):173-82.
- [46] Graves B T, Munro C L. Epigenetics in critical illness: a new frontier. *Nurs Res Pract*. 2013: 503686.

Table 1: Recent studies with 593C>T *GPx1* polymorphism in different conditions.

| Author | Subjects' Origin | N | Risk to | Association with 593T <i>GPx1</i> allele |
|---------------------------------------|------------------|------|------------------------------------|--|
| Ratnasinghe <i>et al.</i> , 2000 [34] | European | 315 | Lung cancer | S |
| Hansen <i>et al.</i> , 2009 [26] | European | 1154 | Colorectal cancer | Ns |
| Jablonska 2009 [43] | European | 405 | More Selenium in plasma | S |
| Kucukgergin <i>et al.</i> , 2011 [32] | Eurasian | 293 | Prostate cancer | S |
| Gurbuzier <i>et al.</i> , 2012 [27] | Eurasian | 314 | Tonsillitis; Tonsillar hypertrophy | Ns |
| Kucukgergin <i>et al.</i> , 2012 [31] | Eurasian | 381 | Bladder cancer | S |
| Nahon <i>et al.</i> , 2012 [35] | European | 200 | Hepatitis C with cirrhosis | Ns |
| Ramprasath <i>et al.</i> , 2012 [29] | Asian | 824 | Diabetic cardiovascular disease | S |
| Zheikova <i>et al.</i> , 2012 [31] | European | 210 | Coronary artery disease | S |
| Zhao <i>et al.</i> , 2012 [28] | Asian | 768 | Glioma | S |
| Johnson <i>et al.</i> , 2013 [30] | North American | 585 | Depression | S |

N: number of cases + controls; S: Significant; Ns: Not significant.

Table 2: Critically ill patients' clinical and demographic data according to the 593C>T *GPx1* SNP genotype groups.

| Variable | ICU patients | 593TT | 593CT+CC | P Value | Test |
|--------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------|------|
| Frequency [N (%)] | 626 (100.0) | 94 (15.01) | 532 (84.98) | 0.654 | HW |
| Female [N (%)] | 300 (47.92) | 42 (44.68) | 258 (48.49) | 0.495 | CS |
| Age [mean (SD)] | 54.76 (20.03) | 55.22 (16.90) | 54.68 (20.55) | 0.923 | MW |
| SOFA-1 [median (min-max)] | 6.56 (1-18) | 6.85 (1-17) | 6.52 (1-18) | 0.104 | MW |
| SOFA-2 [median (min-max)] | 6.51 (1-18) | 6.59 (1-18) | 6.50 (1-17) | 0.882 | MW |
| SOFA-3 [median (min-max)] | 6.31 (1-18) | 6.78 (1-18) | 6.24 (1-18) | 0.428 | MW |
| SOFA-4 [median (min-max)] | 6.20 (1-22) | 6.58 (1-18) | 6.14 (1-22) | 0.512 | MW |
| SOFA-5 [median (min-max)] | 6.11 (1-20) | 6.36 (1-20) | 6.07 (1-19) | 0.654 | MW |
| SOFA-6 [median (min-max)] | 6.07 (1-21) | 6.07 (1-21) | 6.07 (1-20) | 0.748 | MW |
| SOFA-7 [median (min-max)] | 5.87 (1-24) | 6.03 (1-18) | 5.84 (1-24) | 0.521 | MW |
| SOFA-15 [median (min-max)] | 5.95 (1-19) | 6.85 (2-15) | 5.82 (1-19) | 0.656 | MW |
| SOFA-29 [median (min-max)] | 6.07 (1-14) | 4.83 (3-10) | 6.30 (1-14) | 0.641 | MW |
| APACHE-II score [mean (SD)] | 19.03 (7.67) | 19.56 (7.24) | 18.94 (7.44) | 0.276 | MW |
| Sepsis [N (%)] | 463 (73.96) | 65 (69.14) | 398 (74.81) | 0.249 | CS |
| Septic shock [N (%)] | 327 (52.23) | 50 (53.19) | 277 (52.06) | 0.841 | CS |
| ICU LOS [median (min-max)] | 17.78 (1-125) | 18.64 (1-91) | 17.63 (1-125) | 0.350 | MW |
| ICU + H LOS [median (min-max)] | 37.29 (1-242) | 33.91 (1-135) | 37.90 (1-242) | 0.743 | MW |
| Mortality in ICU [N (%)] | 250 (40.32) | 49 (52.13) | 201 (38.22) | 0.009* | CS |

593TT = homozygotes; 593CT+CC = heterozygotes; 593CC = homozygotes; APACHE-II = Acute Physiology

and Chronic Health Evaluation II; ICU = intensive care unit; ICU+H = ICU plus hospital; LOS = length of stay; N

= number; SD = standard deviation; HW = Pearson chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium; MW =

Mann-Whitney U-test; HW: Hardy-Weiberg; CS: Chi-Square.

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos genéticos são importantes para compreender a complexidade do estresse oxidativo humano e como o organismo responde à situações extremas. Glutationa peroxidase (*GPx*) é uma das primeiras enzimas de defesa antioxidantes endógena, e trabalha em cooperação para desintoxicar radicais livres a partir do meio celular. Como citado no presente trabalho, estudos anteriores com uma variante de nucleotídeo único no gene *GPx1* (593C>T SNP; rs1050450; variante proteica Pro198Leu) mostraram que portadores do alelo 593T apresentam maior risco de câncer colorretal, tonsilites, glioma, diabetes, doenças cardiovasculares e depressão. Outros estudos concluíram que pacientes com genótipo 593TT para o gene *GPx1* tinham elevadas taxas de doença arterial coronariana, câncer de próstata, câncer de bexiga, câncer de pulmão, e hepatite C com cirrose quando comparado com os homozigotos 593CC.

Aqui, nós genotipamos o SNP 593C>T do gene *GPx1* em 626 pacientes internados em uma Unidade de Tratamento Intensivo (UTI), em Porto Alegre, RS. Os pacientes foram monitorados diariamente (até o período máximo de 224 dias), e os analisamos de acordo com a ocorrência de disfunção orgânica, sepse, choque séptico e mortalidade. Também consideramos a genotipagem prévia do SNP 47C>T do gene *SOD2* anteriormente realizada pelo nosso grupo (publicada em Paludo *et al.*, 2013) nestes mesmos pacientes criticamente doentes, para avaliarmos seu desfecho diante dos resultados do SNP 593C>T *GPx1*.

Nosso estudo revelou uma associação significativa do genótipo 593TT *GPx1* em indivíduos criticamente doentes com resultado adverso (mortalidade), quando comparados com indivíduos com genótipos 593CT ou 593CC *GPx1*. Percebeu-se que o grupo de pacientes 593TT *GPx1* foi mais suscetível durante o estado crítico, tendo uma taxa de mortalidade mais elevada. Centenas ou milhares de fatores extrínsecos e intrínsecos podem determinar simultaneamente a susceptibilidade e o desfecho de uma condição crítica. Cada efeito externo e cada um dos genes herdados exercerão isoladamente um pequeno efeito mas que, cumulativamente, no somatório com os demais, direcionarão o desfecho. O estado de

saúde, o prognóstico e o desfecho de pacientes estão, portanto, também relacionados à herança genética do indivíduo. Com base em nossos resultados, acreditamos que o genótipo 593TT *GPx1* poderia ser associado, mesmo que não completamente, a uma maior propensão de desequilíbrio do controle celular oxidativo, assim, podemos sugerir que o SNP 593C>T *GPx1*, no seu contexto genômico, como um marcador candidato para ajudar a compreender a susceptibilidade para o paciente criticamente grave.

Em nossa análise conjunta com as duas variantes genéticas *GPx1* e *SOD2* identificamos uma diferença significativa de maior frequência de choque séptico entre pacientes sépticos com os alelos 593T *GPx1* e 47C *SOD2*, quando comparado com pacientes sépticos com outras configurações de genótipos. Acreditamos que este resultado pode ser considerado importante em futuras abordagens neste campo de estudo. Com base em nossos resultados, contudo, não estamos aptos a indicar como as variantes 593C>T *GPx1* ou 47C>T *SOD2* conferem mais susceptibilidade ao desfecho do paciente. No entanto, deve ser considerado que a doença crítica está relacionada com a depleção grave de antioxidantes, e esse cenário aumenta o risco de mortalidade do paciente na UTI. O fato de as enzimas antioxidantes apresentarem um desbalanço inato pode contribuir para o desfecho desfavorável.

Estudos com pacientes críticos buscam informações que permitam compreender sua condição e como elevar as taxas de sua recuperação. Dados do Instituto Latino Americano de sepse mostram que são gastos anualmente cerca de 15 bilhões de reais com o tratamento de pacientes críticos e, os estudos sobre o assunto, vêm levantando a possibilidade de que determinados variantes gênicas possam influenciar, de fato, de forma significativa o desfecho dos pacientes. Apesar de nossos resultados positivos, acredita-se estar ainda muito longe da obtenção de uma resposta concreta sobre quais os reais fatores que contribuem para a condição crítica. Há ainda muito que se descobrir sobre a contribuição do estresse oxidativo celular e de como o organismo humano responde aos diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos. Trabalhar com estas variantes polimórficas de genes envolvidos nas vias de controle oxidativo foi um esforço na busca de desvendar parte do pequeno efeito que a herança genética pode ter sobre o processo durante a condição crítica e sua relação com o desfecho clínico.

Finalmente, o presente estudo fornece evidências estatísticas de que o SNP 593C>T *GPx1* sozinho ou em efeito sinérgico com o SNP 47C>T *SOD2* foi associado com a evolução dos pacientes criticamente doentes aqui estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO DE VEJA, J. M.; DÍAZ, J.; SERRANO, E.; CARBONELL, L. F. Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*, 30:1782-86, 2002.
- BASTAKI, M.; HUEN, K.; MANZANILLO, P.; CHANDE, N.; CHEN, C.; BALMES, J. R.; TAGER, I. B.; HOLLAND, N. Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. *Pharmacogenet Genom*, 16:279–286, 2006.
- BATRA, S.; KUMAR, R.; KAPOOR, A. K.; RAY, G. Alterations in antioxidant status during neonatal sepsis. *Ann Trop Paediatr.*, 20(1):27-33, 2000.
- BECK, Y.; OREN, R.; AMIT, B.; ET AL. Human Mn superoxide dismutase cDNA sequence. *Nucleic Acids Res.*, 15(21):9076, 1987.
- BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem*, 272:19633–19636, 1997.
- BERGER, M. M.; CHIÓLERO, R. Antioxidant supplementation in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*, 35: S584-S90, 2007.
- BERNARD, G.R.; VINCENT, J. L.; LATERRE, P.F. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*, 344: 699-709, 2001.
- BLACK, H. S. Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. *Photochemistry and Photobiology*, 46:213-221, 1987.
- BORGSTAHL, G. E.; PARGE, H. E.; HICKEY, M. J.; ET AL. Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface. *Biochem.*, 35(14):4287-4297, 1996.
- BOVERIS, A.; ALVAREZ, S.; NAVARRO, A. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic Biol Med.*, 33(9):1186-1193, 2002.
- BREALEY, D.; BRAND, M.; HARGREAVES, I.; HEALES, S.; LAND, J.; SMOLENSKI, R.; DAVIES, N. A.; COOPER, C. E.; SINGER, M. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet.*, 360(9328):219-223, 2002.
- BREALEY, D.; SINGER, M. Mitochondrial Dysfunction in Sepsis. *Curr Infect Dis Rep.*, 5(5):365-371, 2003.
- BRICENO BALCAZAR, I. Medicina Genómica. *Colomb. Med.*, 42(1): 134-135, 2011.
- BUTKUS DE AGUIAR, B.; ALHO, C. S.; GIRARDI, I.; DE FRANCA, E.; DORNELLES, C.; SUPARREGUI DIAS, F.; BONORINO, C.; SAMPAIO, C. S. CD14 Expression in the First 24h of Sepsis: Effect of -260C>T CD14 SNP. *Immunological Investigations*, 37: 752-769, 2008.
- CARROLL, P. Protein metabolism and the use of growth hormone and insulin-like growth factor-I in the critically ill patient. *Growth Horm IGF Res*, 9:400–13, 1999.
- CHURCH, SL.; GRANT, J. W.; MEESE, E. U.; ET AL. Sublocalization of the gene encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) to 6q25 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid mapping. *Genomics.*, 14: 823–825, 1992.
- COLLINS, F. C.; GREEN, E. D.; GUTTMACHER, A. E.; GUYER, M. S. A vision for the future genomics research. *Nature*, 422, 835-846, 2003.

- CRIMI, E.; SICA, V.; WILLIAMS-IGNARRO, S. The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Radic Biol Med*, 40: 398-406, 2006.
- D'AVILA, L. C.; ALBARUS, M. H.; FRANCO, C. R.; AGUIAR, B. B.; OLIVEIRA, J. R.; DIAS, F. S.; ALHO, C. S. Effect of CD14 -260C>T polymorphism on the mortality of critically ill patients. *Immunology and Cell Biology*, 84, 342-348, 2006.
- DIAS, F. S.; EIDT, M. V.; DUQUIA, R. P. Clinical factors 12. associated with mortality in septic shock [poster 20]. *CritCare*, 11(Suppl 3):S9. [4th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine for LatinAmerica; 2007 June 20-23; São Paulo, Brazil]. Disponível em: <http://ccforum.com/content/11/S3/P20>
- ESPAT, N. J.; HELTON, W. S. Oxygen free radicals, oxidative stress, and antioxidants in critical illness. *Support Line*, 22:11-20, 2000.
- FALLAVENA, P. R. V.; BORGES, T. J.; PASKULIN, D. D.; THUROW, H. S.; PALUDO, F. J. O.; FROES, C. S.; GRAEBIN, P.; DIAS, F. S.; NÓBREGA, O. T.; ALHO, C. S. The Synergy of -260T T and -308GG Genotypes in Survival of Critically Ill Patients. *Scandinavian Journal of Immunology*, 77: 62-68, 2013.
- FINK, M. P.; EVANS, T. W. Mechanisms of organ dysfunction in critical illness: report from a Round Table Conference held in Brussels. *Int Care Med*, 28(3):369-375, 2002.
- FORCEVILLE, X.; MOSTERT, V.; PIERANTONI, A.; VITOUX, D.; LE TOUMELIN, P.; PLOUVIER, E.; DEHOUX, M.; THUILLIER, F.; COMBES, A. Selenoprotein P, rather than glutathione peroxidase, as a potential marker of septic shock and related syndromes. *Eur Surg Res*, 43(4):338-47, 2009.
- FRAGA, L. R.; PALUDO, F. J. O.; BÓS, A. J. G.; FERRARO, J. L. S.; DIAS, F. S.; ALHO, C. S. More severe clinical course of cardiovascular dysfunction in intensive care unit patients with the 894TT eNOS genotype. *Genetics and Molecular Research*, 12 (1): 562-568, 2013.
- FUHRMAN, M. P.; HERRMANN, V. M.; SMITH, G. S. Reactive oxygen species and glutathione: potential for parenteral nutrition supplementation? *Nutr Clin Pract*, 14:254-263, 1999.
- GALLEY, H. Bench-to-bedside review: targeting antioxidants to mitochondria in sepsis. *Crit Care*, 14:230, 2010.
- GÄRTNER, R.; ANGSTWURM, M. Significance of selenium in intensive care medicine. Clinical studies of patients with SIRS/sepsis syndrome. *Med Klin (Munich)*, 15(94)3:54-7, 1999.
- GELLERICH, F. N.; TRUMBECKAITE, S.; OPALKA, J. R.; ET AL. Mitochondrial dysfunction in sepsis: evidence from bacteraemic baboons and endotoxaemic rabbits. *Biosci Rep*, 22(1):99-113, 2002.
- GIUGLIANO, D.; CERIELLO, A.; PAOLISSO, G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, 19:257-267, 1996.
- GOODE, H. F.; COWLEY, H. C.; WALKER, B. E.; HOWDLE, P. D.; WEBSTER, N. R. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med*, 23: 646-651, 1995.
- GRAEBIN, P ; VEIT TD ; ALHO, C. S. ; DIAS, F S; CHIES, J A. Polymorphic variants in exon 8 at the 3' UTR of the HLA-G gene are associated with septic shock in critically ill patients. *Critical Care*, 16:R211, 2012.
- GRIENGLING, K.; USHIO-FUKAI, M. Redox control of vascular smooth muscle proliferation. *J Lab Clin Med*, 132:9-15, 1998.
- GRIMBLE, R. F. Nutrition antioxidants and the modulation of inflammation theory and practice. *New Horiz*, 2:175-185, 1994.
- GUHA, M.; MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Sign*, (13): 85-94, 2001.

- GUIDOT, D. M.; MCCORD, J. M.; WRIGHT, R. M.; REPINE, J. E. Absence of electron transport (Rho 0 state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. *J Biol Chem.*, 268(35) 26699- 26703, 1993.
- GURBUZIER, L.; SOGUT, E.; KOC, S.; EYIBILEN, A.; YELKEN, K.; SENKAL, H. A.; AKSAKAL, C. Manganese-superoxide dismutase and glutathione peroxidase 1 polymorphisms in recurrent tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 76(9):1270-3, 2012.
- GUTTERIDGE, J.; MITCHELL, J. Redox imbalance in the critically ill. *Br Med Bull*, 55:49-75, 1999.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C.M. Free Radicals in Biology and Medicine. 3th ed. Oxford University Press, 1999.
- HAMANISHI, B.; FURUTA, H.; KATO, H.; DOI, A.; TAMAI, M.; SHIMOMURA, H.; SAKAGASHIRA, S.; NISHI, M.; SASAKI, H.; SANKE, T.; NA, K. Functional variants in the GPx1 gene are associated with increased intima media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular disease. *Diabetes*, 28(9): 2455-2460, 2004.
- HAMMARQVIST, F.; LUO, J. L.; COTGREAVE, I. A.; ANDERSSON, K.; WERNERMAN, J. Skeletal muscle glutathione is depleted in critically ill patients. *Crit. Care Med.*, 25:78– 83, 1997.
- HAMMERMAN, C.; KAPLAN, M. Ischemia and reperfusion injury. *Clin Perinatol*, 25:757-777, 1998.
- HANSEN R. D. GPx1 Pro(198)Leu polymorphism, erythrocyte GPx activity, interaction with alcohol consumption and smoking, and risk of colorectal cancer. *Mutat Res.* 664(1-2):13-19, 2009.
- HARGRAVES, W. A.; HENTALL, I. D. Analgesic effects of dietary caloric restriction in adult mice. *Pain*, 114: 455-461, 2005.
- HERNANDEZ-SAAVEDRA, D.; MCCORD, J. M. Paradoxical effects of thiol reagents on Jurkat cells and a new thiol-sensitive mutant form of human mitochondrial superoxide dismutase. *Cancer Res.*, 63(1):159-163, 2003.
- HIROI, S.; HARADA, H.; NISHI, H.; ET AL. Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun.*, 261(2):332-339, 1999.
- HO, Y. S.; CRAPO, J. D. Isolation and characterization of complementary DNAs encoding human manganese-containing superoxide dismutase. *FEBS Lett.*, 229(2):256-260, 1988.
- HOLMES, C. L.; RUSSEL, J. A.; WALLEY, K. R. Genetic Polymorphisms in Sepsis and Septic Shock. *Chest*, 124:1103-1115, 2003.
- HU, Y. J.; DIAMOND, A. M. Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. *Cancer Res.* 63(12):3347-3351, 2003.
- JABLONSKA, E.; GROMADZINSKA, J.; RESZKA, E.; WASOWICZ, W.; SOBALA, W.; SZESZENIA-DABROWSKA N; BOFFETTA, P. Association between GPx1 Pro198Leu polymorphism, GPx1 activity and plasma selenium concentration in humans. *Eur J Nutr*, 48:383, 2009.
- JEEVANANDAM, M.; BEGAY, C. K.; SHAHBAZIAN, L. M.; SCOTT, R.; PETERSEN, M. D. Altered plasma cytokines and total glutathione levels in parenterally fed critically ill trauma patients with adjuvant recombinant human growth hormone therapy. *Crit Care Med*, 28:324-329, 2000.
- JOHNSON; PHILLIPS, J. A.; MAUER, C.; EDWARDS, M.; BALLDIN, V. H.; HALL, J. R.; BARBER, R.; TORI, L. C.; ERIC, J. H.; SID, E. O. The impact of GPx1 on the association of groundwater selenium and depression: a project Frontier study. *BMC Psychiatry*, 13:7, 2013.
- KOTSOVOLIS, G.; KALLARAS, K. The role of endothelium and endogenous vasoactive substances in sepsis. *Hippokratia*, 8:88–93, 2010.

- KUCUKGERGIN, C.; GOKPINAR, M.; SANLI, O.; TEFIK, T.; OKTAR, T.; SECKIN, S. Association between genetic variants in glutathione peroxidase 1 (GPx1) gene, GPx activity and the risk of prostate cancer. *A Journal on Nephrology and Urology*, 63(3):183-90, 2011.
- KUCUKGERGIN, C.; ISMAN, F. K.; CAKMAKOGLU, B.; SANLI, O.; SECKIN, S. Association of polymorphisms in MCP-1, CCR2, and CCR5 genes with the risk and clinicopathological characteristics of prostate cancer. *DNA Cell Biol*, 31(8):1418-24, 2012.
- LEBOVITZ, R. M.; ZHANG, H.; VOGEL, H.; ET AL. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 93(18):9782-9787, 1996.
- LI, Y.; HUANG, T. T.; CARLSON, E. J.; ET AL. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.*, 11:376-381, 1995.
- LIU, Y.; FISKUM, G.; SCHUBERT, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem.*, 80(5):780-787, 2002.
- LOVAT, R.; PRESIER, J. C. H. Antioxidant therapy in intensive care. *Curr Opin Crit Care*, 9:266-270, 2003.
- MATES, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153:83-104, 2000.
- METNITZ, P. G. H.; BARTENS, C.; FISCHER, M.; ET AL. Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.*, 25:180-185, 1999.
- MOTOYAMA T, OKAMOTO K, KUKITA I, HAMAGUCHI M, KINOSHITA Y, OGAWA H: Possible role of increase oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*, 31:1048-1052, 2003.
- NAHON, P.; SUTTON, A.; RUFAT, P.; CHARNAUX, N.; MANSOURI, A.; MOREAU, R.; GANNE-CARRIÉ, N.; GRANDO-LEMAIRE, V.; N'KONTCHOU, G.; TRINCHET, J. C.; PESSAYRE, D.; BEAUGRAND, M. A variant in myeloperoxidase promoter hastens the emergence of hepatocellular carcinoma in patients with HCV-related cirrhosis. *J Hepatol.*, 56(2):426-32, 2012.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.*, 31(11):1287-312, 2001.
- NOVAK, F.; HEYLAND, D. K.; AVENELL, A.; DROVER, J. W.; SU, X. Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. *Crit. Care Med.*, 30:2022-2029, 2002.
- PALUDO F J O, PICANÇO J B, FALLAVENA P R V, FRAGA L R, GRAEBIN P, NÓBREGA O T, DIAS F S, ALHO C. S: Higher frequency of septic shock in septic patients with the 47C allele (rs4880) of the SOD2 gene *Gene*, 517(1):106-11, 2013.
- PASKULIN, D. D.; FALLAVENA, P. R. V.; PALUDO, F. J. O. ; BORGES, T. J.; PICANÇO, J. B. ; DIAS, F. S.; ALHO, C. S. . TNF - 308G > A promoter polymorphism (rs1800629) and outcome from critical illness. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15: 231-238, 2011.
- PEARCE, L. L.; EPPERLY, M. W.; GREENBERGER, J.S.; PITT, B. R.; PETERSON, J. Identification of respiratory complexes I and III as mitochondrial sites of damage following exposure to ionizing radiation and nitric oxide. *Nitric Oxide.*, 5(2):128-136, 2001.
- PEDROSO, J. A. R.; PASKULIN, D. D.; DIAS, F. S.; FRANÇA, E. DE ; ALHO, C. S. Análise da tendência temporal de dano renal agudo entre pacientes graves conforme polimorfismos I/D e -262A > T da enzima conversora da angiotensina. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 32: 182-194, 2010.

- QUASIM, T.; MCMILLAN, D. C.; TALWAR, D.; SATTAR, N.; O'REILLY, D.; KINSELLA, J. Lower concentrations of carotenoids in the critically ill patient are related to a systemic inflammatory response and increased lipid peroxidation. *Clinical Nutrition*, 22, 459–462, 2003.
- RAMPRASATH, T.; MURUGAN, P. S.; KALAIARASAN, E.; GOMATHI, P.; RATHINAVEL, A.; SELVAM, G. S. Genetic association of Glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1(NQO1) variants and their association of CAD in patients with type-2 diabetes. *Mol Cell Biochem*, 361(1-2):143-50, 2012.
- RATNASINGHE, D.; TANGREA, J. A.; ANDERSEN, M. R.; BARRETT, M. J.; VIRTAMO, J.; TAYLOR, P. R.; ALBANES, D. Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Res*, 60: 6381-83, 2000.
- ROSENBLUM, J. S.; GILULA, N. B.; LERNER, R. A. On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 93(9):4471-4473, 1996.
- ROTH, E.; MANHART, N.; WESSNER, B. Assessing the antioxidative status in critically ill patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 7:161-168, 2004.
- SALVEMINI, D.; CUZZOCREA, S. Therapeutic potential of superoxide dismutase mimetics as therapeutic agents in critical care medicine. *Crit Care Med.*, 31(1 Suppl):S29-38, 2003.
- SCHOONOVER, L. L. Oxidative stress and the role of antioxidants in cardiovascular risk reduction. *Prog Cardiovasc Nurs.*, 16:30-32, 2001.
- SCHULTE, J.; STRUCK, J.; KOHRLE, J.; MULLER, B. Circulating levels of peroxiredoxin 4 as a novel biomarker of oxidative stress in patients with sepsis. *Shock*, 35:460–465, 2011.
- SHIMODA-MATSUBAYASHI, S.; HATTORI, T.; MATSUMINE, H.; ET AL. MnSOD activity and protein in a patient with chromosome 6-linked autosomal recessive parkinsonism in comparison with Parkinson's disease and control. *Am Acad Neurol.*, 49(5): 1257-1262, 1997.
- SHIMODA-MATSUBAYASHI, S.; MATSUMINE, H.; KOBAYASHI, T.; ET AL. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun.*, 226(2):561-565, 1996.
- ST CLAIR, D. Manganese superoxide dismutase: genetic variation and regulation. *J Nutr.*, 134(11):3190S-3191S, 2004.
- STREAT, S. J.; BEDDOE, A. H.; HILL, G. L. Aggressive nutritional support does not prevent protein loss despite fat gain in septic intensive care patients. *J Trauma*, 27:262–6, 1987.
- SUREDA, A.; TAULER, P.; AGUILÓ, A.; CASES, N.; FUENTESPINA, E.; CÓRDOVA, A.; TUR, J. A.; PONS, A. Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. *Free Rad Res*, 39:317-1324, 2005.
- SUTTON, A.; IMBERT, A.; IGOUDJIL, A.; ET AL. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics.*, 15(5):311-319, 2005.
- SUZEN, H. S.; GUCYENER, E.; SAKALLI, O.; UCKUN, Z.; KOSE, G.; USTEL, D.; DUYDU, Y. Cat C-262T and GPx1 Pro198Leu polymorphisms in a Turkish population. *Mol Biol Rep.*, 37(1):87-92, 2009.
- TAYLOR, D. E.; GHIO, A. J.; PIANTADOSI, C. A. Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis. *Arch Biochem Biophys.*, 316: 70-76, 1995.
- THEROND, P.; BONNEFONT-ROUSSELOUT, D.; DAVIT-SPARAUL, A.; CONTI, M.; LEGRAND, A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 3:373-384, 2000.

- THUROW, H.S. ; HARTWIG, F. P. ; ALHO, C. S. ; SILVA, D.S.B.S ; ROESLER, R. ; ABUJAMRA, A. L. ; FARIAS, C. B. ; BRUNETTO, A. L. ; HORTA, B. L. ; DELLAGOSTIN, O. A. ; COLLARES, T. V. ; SEIXAS, F. K. . Ewing Sarcoma: influence of TP53 Arg72Pro and MDM2 T309G SNPs. *Molecular Biology Reports*, p. 1-1, 2013.
- THUROW, H. S.; SARTURI, C. R. ; FALLAVENA, P. R. V.; DE OLIVEIRA PALUDO, F. J.; PICANÇO, J. B.; FRAGA, L. R.; GRAEBIN, P.; DE SOUZA, V. C.; DIAS, F. S.; DE TOLÊDO NÓBREGA, O. ; ALHO, C. S. Very Low Frequencies of Toll-Like Receptor 2 Supposed-2029T and 2258A (RS5743708) Mutant Alleles in Southern Brazilian Critically Ill Patients. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, v. 14, p. 405-419, 2010.
- TOPPO, S.; FLOH, E. L.; URSINI, F.; VANIN, S.; MAIORINO, M. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: Variations of a basic scheme. *Biochim. Biophys. Acta*, 1790, 1486– 1500, 2009.
- WAN, X. S.; DEVALARAJA, M. N.; ST. CLAIR, D. K. Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol.*, 13: 1127–1136, 1994.
- WEISIGER, R. A.; FRIDOVICH, I. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem*, 248:4793-4796, 1973.
- WISPÉ, J. R.; CLARK, J. C.; BURHANS, M. S.; ET AL. Synthesis and processing of the precursor for human manganese-superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta.*, 994(1):30-36, 1989.
- WRIGHT, F. A.; LEMON, W. J.; ZHAO, W. D.; SEARS, R.; ZHUO, D.; WANG, J-P.; YANG, H-Y.; BAER, T.; STREDNEY, D.; SPITZNER, J.; STUTZ, A.; KRAHE, R.; YUAN, B. A draft annotation and overview of the human genome. *Genome Biol.*, 2(7):Research0025. Epub, 2001.
- VALENTA, J.; BRODSKA, H.; DRABEK, T.; HENDL, J.; KAZDA, A. High-dose selenium substitution in sepsis: a prospective randomized clinical trial. *Intensive Care Med.*, 37(5):808-15, 2011.
- VAN DEN BERGHE, G. Endocrine evaluation of patients with critical illness. *Endocrinol Metab Clin N Am*, 32: 385–410, 2003.
- VAN DEN BERGHE, G.; BAXTER, R. C.; WEEKERS, F. A paradoxical gender dissociation within the growth hormone. insulin-like growth factor I axis during protracted critical illness. *J Clin Endocrinol Metab*, 85:183–92, 2000.
- VAN REMMEN, H.; SALVADOR, C.; YANG, H.; ET AL. Characterization of the antioxidant status of the heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mouse. *Arch Biochem Biophys.*, 363(1):91-97, 1999.
- VICENT, J. L. Sepsis: The magnitude of the problem In. *The Sepsis Text. Kluwer Academy Publisher*, 2002.
- VINCENT, J. L.; ZHANG, H.; SZABO, C.; PREISER, J. C. Effects of Nitric Oxide in Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med.*, 161(6):1781-1785, 2000.
- XU, Y.; KRISHNAN, A.; WAN, X. S.; ET AL. Mutations in the promoter reveal a cause for the reduced expression of the human manganese superoxide dismutase gene in cancer cells. *Oncogene.*, 18(1):93-102, 1999.
- ZANG, Q.; MAASS, D. L.; TSAI, S. J.; HORTON, J. W. Cardiac mitochondrial damage and inflammation responses in sepsis. *Surg Infect (Larchmt).*, 8(1):41-54, 2007.
- ZHAO, H.; LIANG, D.; GROSSMAN, H. B.; WU, X. Glutathione peroxidase 1 gene polymorphism and risk of recurrence in patients with superficial bladder cancer. *Urology*, 66:769- 774, 2005.
- ZHAO, P.; ZHAO, L.; ZOU, P.; LU, A.; LIU, N.; YAN, W.; KANG, C.; FU, Z.; YOU, Y.; JIANG, T. Genetic oxidative stress variants and glioma risk in a Chinese population: a hospital-based case–control study. *BMC Cancer*, 12:617, 2012.
- ZHEIKOVA, T. V.; GOLUBENKO, M. V.; BUIKIN, S. V.; BOTKINA, O. Y.; MAKEEVA, O. A.; LEZHNEV, A. A.; KALYANOV, E. V.; TSIMBALYUK, I. V.; MAKSIMOV, V. N.; VOEVODA, M. I.; SHIPULIN, V. M.; PUZYREV, V. P. Glutathione peroxidase

1 (GPx1) single nucleotide polymorphism Pro198→Leu: Association with life span and coronary artery disease. *Molecular Biology.*, 46 (3):433-437, 2012.