

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUISTA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA EM CLÍNICA MÉDICA**

**Nara Aline Costa**

**Avaliação da atividade eritrocitária da superóxido dismutase 1 como  
biomarcador precoce do desenvolvimento de lesão renal aguda em pacientes  
com choque séptico**

**Botucatu**

**2016**

*Nara Aline Costa*

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ERITROCITÁRIA DA  
SUPERÓXIDO DISMUTASE 1 COMO BIOMARCADOR  
PRECOCE DO DESENVOLVIMENTO DE LESÃO RENAL  
AGUDA EM PACIENTES COM CHOQUE SÉPTICO**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. *Marcos Ferreira Minicucci*

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. *Ana Lúcia Gut*

**Botucatu  
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Costa, Nara Aline.

Avaliação da atividade eritrocitária da superóxido dismutase 1 como biomarcador precoce do desenvolvimento de lesão renal aguda em pacientes com choque séptico / Nara Aline Costa. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu  
Orientador: Marcos Ferreira Minicucci  
Coorientador: Ana Lúcia Gut  
Capes: 40101002

1. Rins - Doenças. 2. Insuficiência renal aguda. 3. Stress oxidativo. 4. Sepsis. 5. Choque séptico. 6. Superóxido dismutase. 7. Marcadores bioquímicos.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Lesão renal aguda; Sepsis; Superóxido dismutase.

**ΕΠΙΓΡΑΦΕ**

“Tudo tem a sua ocasião própria e há tempo para  
todo propósito debaixo do céu.”

**DEDICATÓRIA**

Aos PACIENTES e FAMILIARES, que apesar do momento de sofrimento pelo qual passavam foram generosos e possibilitaram a realização desse trabalho.

# **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A DEUS e a ESPIRITUALIDADE por sempre estarem ao meu lado, mostrando o quanto eu posso ir mais além. Agradeço por, ao invés de uma profissão, ter conquistado uma grande paixão e, ao invés de um trabalho, a oportunidade diária de ajudar ao próximo.

Aos meus pais ANTONIO e MARIZA, por não terem medido esforços para que eu pudesse realizar os meus sonhos e por terem me ensinado a enfrentar todas as dificuldades sempre com otimismo e perseverança.

A minha irmã NÍDIA e a minha avó MARIA por vibrarem comigo a cada conquista, por estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis e por me apoiarem incondicionalmente.

Ao querido professor MARCOS MINICUCCI pela orientação desse trabalho, amizade e confiança. Agradeço pela incrível oportunidade de aprendizado, pelo amadurecimento pessoal e profissional que me proporcionou, por sempre me atender com entusiasmo e paciência, mas principalmente, por ter despertado em mim o amor à pesquisa. É um grande privilégio poder conviver com alguém tão brilhante e humano como você!

# **AGRADECIMENTOS**

## Agradeço aos PROFESSORES

Profa. ANA GUT pela contribuição fundamental na identificação dos pacientes durante o período de coleta, pela paciência, generosidade e principalmente pela amizade cultivada durante a realização desse trabalho.

Prof. SÉRGIO PAIVA pela contribuição científica durante toda a minha pós-graduação e amizade. Um brilhante pesquisador e um grande incentivador, pois sempre me deu boas respostas e muitas outras dúvidas!

Profs. BERTHA FURLAN e LEONARDO ZORNOFF pelas valiosas contribuições durante a realização desse trabalho e no Exame Geral de Qualificação. É imensa a admiração e respeito que tenho por vocês.

Profa. SÍLVIA COZZOLLINO por generosamente nos conceder espaço para a realização de algumas análises desse estudo.

## Às minhas AMIGAS

NATÁLIA BARALDI por, além de ser uma grande amiga, ter contribuído com a coleta dos pacientes e me apoiado nos momentos bons e ruins.

Pós-graduandas ANDRÉIA GONÇALVES, BRUNA PEREIRA e BRUNA RAFACHO pelo companheirismo, ajuda e aprendizado desde o mestrado.

As nutricionistas da Unidade de Diálise MARINA BUFARAH, MARYANNE ZILLI e NAYRANA REIS que foram muito compreensivas durante o período de finalização dessa tese e por terem me oferecido amizade, conhecimento e alegrias sem tamanho, muito obrigada!

Aos FUNCIONÁRIOS DA SECRETARIA DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

ALEXANDRE, BRUNO, ELISÂNGELA, LAURA, MÁRIO E RENATO que nos atendem sempre com muito profissionalismo e bom humor. Meus sinceros agradecimentos.

A TODOS OS FUNCIONÁRIOS DA UNIDADE DE PESQUISA EXPERIMENTAL, em especial ao “ZÉ” e ao MÁRIO (*in memorian*) por sempre me “socorrerem” nos momentos de dificuldade, por fazerem companhia em muitos finais de semana de trabalho e por me tratarem com tanto carinho e respeito.

À nefrologista Dra. DANIELA PONCE, exemplo de competência e dedicação aos doentes renais. Agradeço pela contribuição fundamental no delineamento e interpretação dos resultados desse trabalho e pela disponibilidade em responder às minhas dúvidas.

Aos MÉDICOS INTENSIVISTAS, RESIDENTES, ENFERMEIROS e TÉCNICOS DE ENFERMAGEM que contribuíram durante todo o período da coleta dos pacientes, tornando possível a realização desse trabalho. Obrigada pela amizade, pelos momentos de descontração durante o trabalho cansativo e pelos inesquecíveis “tubinhos”.

Aos ALUNOS e ao técnico ALEXANDRE PIMENTEL do Laboratório de Nutrição e Minerais/USP por me receberem de braços abertos e contribuírem para a realização de algumas análises.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e a FAPESP pelo apoio financeiro da pesquisa.

**Meus sinceros agradecimentos.**

# SUMÁRIO

Resumo .....	1
Abstract .....	4
Introdução .....	7
Hipótese .....	16
Objetivo .....	18
Casística e Métodos .....	20
Resultados .....	26
Discussão .....	35
Conclusão .....	43
Referências .....	45
Anexo 1. Artigo: Erythrocyte superoxide dismutase as a biomarker of septic acute kidney injury .....	53

# **LISTA DE ABREVIACÕES**

**APACHE II** – Acute Physiology and Chronic Health Evaluation  
**CTI** – Centro de Terapia Intensiva  
**CLR** – C-type lectin receptor  
**DMO** – Disfunção de múltiplos órgãos  
**DP** – Diálise Peritoneal  
**DRC** – Doença Renal Crônica  
**EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético  
**ERNs** – Espécies Reativas de Nitrogênio  
**EROs** – Espécies Reativas de Oxigênio  
**FDA** – Food and Drug Administration  
**FMB** – Faculdade de Medicina de Botucatu  
**GMP** – Monofosfato de guanosina  
**HC** – Hospital das Clínicas  
**HD** – Hemodiálise  
**HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
**IGFBF** – Proteína semelhante ao fator de crescimento ligado a insulina  
**K** – Potássio  
**KIM1** – Kidney injury molecule-1  
**KDIGO** – Kidney Disease Improving Global Outcomes  
**LRA** – Lesão Renal Aguda  
**MDA** - Malondialdeído  
**Na** – Sódio  
**NADPH** – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
**NGAL** – Neutrophil gelatinase-associated lipocalin  
**NLR** – Nucleotide binding oligomerization domain-like receptors  
**P** – Fósforo  
**PCR** – Proteína C Reativa  
**RLR** – Retinoic acid inducible gene like receptors  
**SETI** – Serviço de Terapia Intensiva  
**SIRS** – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica  
**SOD 1** – Superóxido dismutase 1  
**SOFA** – Sequential Organ Failure Assessment  
**TFG** – Taxa de Filtração Glomerular  
**TIMP 2** – Inibidor tecidual urinário de metaloproteinase 2  
**TLR** – Toll-like receptors  
**TNF  $\alpha$**  – Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$   
**UTI** – Unidade de Terapia Intensiva  
**VM** – Ventilação Mecânica

**RESUMO**

O estresse oxidativo é reconhecido como característica fundamental da sepse e pode ser uma via comum para o desenvolvimento da lesão renal aguda (LRA). Alguns biomarcadores para a detecção precoce da LRA tem sido estudados, no entanto, apesar da importância no combate ao estresse oxidativo, a atividade da superóxido dismutase 1 (SOD1) ainda não foi avaliada na LRA em pacientes críticos. Nosso objetivo foi avaliar a atividade eritrocitária da SOD1 como preditora de LRA em pacientes com choque séptico.

Este é um estudo prospectivo observacional que avaliou 175 pacientes consecutivos, maiores de 18 anos e com choque séptico na admissão na Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Foram excluídos 43 pacientes. Assim, 132 pacientes foram incluídos no estudo. Nas primeiras 24 horas da admissão dos pacientes, foram coletados os dados demográficos e amostras de sangue para determinação da atividade eritrocitária da SOD1 e da concentração do malondialdeído (MDA). Todos os pacientes foram acompanhados durante a internação na UTI e o desenvolvimento da LRA foi avaliado. Além disso, também foram avaliados 17 indivíduos controle.

A média de idade dos pacientes com choque séptico foi  $63,2 \pm 15,7$  anos, 53% eram homens e a mediana do tempo de internação na UTI foi de 8 (4-16) dias. Aproximadamente 51% dos pacientes desenvolveram LRA durante a internação na UTI. A mediana da atividade eritrocitária da SOD1 foi 2,92 (2,19-3,92) U/mgHb. Quando comparado com os indivíduos controle, os pacientes com choque séptico tiveram uma maior concentração sérica de MDA [grupo choque: 1,4 (0,8-2,2)  $\mu\text{mol/L}$  vs grupo controle: 0,8 (0,5-1,1)  $\mu\text{mol/L}$ ; p: 0,003] e menor atividade eritrocitária da SOD1 [grupo choque: 2,9 (2,2-3,9) U/mgHb vs grupo controle: 4,4 (3,3-4,7) U/mgHb; p: 0,001]. Na análise univariada, a atividade eritrocitária da SOD1 foi menor nos pacientes que desenvolveram LRA. A análise da curva ROC revelou que a menor atividade eritrocitária da SOD1 foi associada com o desenvolvimento LRA no ponto de corte  $< 3,32$  U/mg Hb. No modelo de regressão logística, atividade da SOD1 maior que 3,32 U/mg Hb foi associada com proteção do desenvolvimento de LRA quando ajustado pela hemoglobina, fósforo e escore APACHE II (OR: 0,309; IC 95%: 0,137-0,695; p: 0,005) e quando ajustado pela idade, gênero, doença renal crônica, categoria da admissão (clínica ou

cirurgica) e escore APACHE II (OR: 0,129; IC 95%: 0,033-0,508; p: 0,003). Em conclusão, a atividade eritrocitária da SOD1 é um biomarcador precoce de LRA em pacientes com choque séptico.

**Palavras-chave:** superóxido dismutase; lesão renal aguda; sepse; estresse oxidativo.

**ABSTRACT**

Oxidative stress is recognized as a fundamental characteristic of sepsis and may be a common pathway for the development of acute kidney injury (AKI). Some biomarkers for early detection of AKI have been studied, however, despite the importance in combating oxidative stress, the activity of superoxide dismutase 1 (SOD1) has not been evaluated in AKI in critically ill patients. Our objective was to evaluate erythrocyte SOD1 activity as predictor of AKI in patients with septic shock.

This is a prospective observational study that evaluated 175 consecutive patients over the age of 18 years with septic shock upon Intensive Care Unit (ICU) admission. Forty-three patients were excluded. Thus, 132 patients were enrolled in the study. In the first 24 hours of the patients' enrollment, demographic information was recorded and blood samples were taken to determine the erythrocyte SOD1 activity and the concentration of malondialdehyde (MDA). All patients were followed throughout the ICU stay, and the development of AKI was evaluated. In addition, we also evaluated 17 control subjects.

The mean age of patients with septic shock was  $63.2 \pm 15.7$  years; 53% were male, and the median ICU stay was 8 (4-16) days. Approximately 51% of patients developed AKI during the ICU stay. The median erythrocyte SOD1 activity was 2.92 (2.19-3.92) U/mg Hb. When compared to control subjects, septic shock patients had a higher serum MDA concentration [shock group: 1.4 (0.8-2.2)  $\mu\text{mol/L}$  vs control group: 0.8 (0.5-1.1)  $\mu\text{mol/L}$ ;  $p: 0.003$ ] and lower erythrocyte SOD1 activity [shock group: 2.9 (2.2-3.9) U/mgHb vs control group: 4.4 (3.3-4.7) U/mgHb;  $p: 0.001$ ]. In univariate analysis, erythrocyte SOD1 activity was lower in patients who developed AKI. The ROC curve analysis revealed that lower erythrocyte SOD1 activity was associated with AKI development at the cutoff of  $< 3.32$  U/mg Hb. In the logistic regression models, SOD1 activity higher than 3.32 U/mg Hb was associated with protection of AKI development when adjusted by hemoglobin, phosphorus and APACHE II score (OR: 0.309; CI95%:0.137-0.695;  $p=0.005$ ) and when adjusted by age, gender, disease chronic renal, admission category (medical or surgery) and APACHE II score (OR: 0.129;

CI95%:0.033-0.508;  $p= 0.003$ ). In conclusion, erythrocyte SOD1 activity is an early predictor of AKI in patients with septic shock.

**Keywords:** superoxide dismutase; acute kidney injury; sepsis; oxidative stress.

# INTRODUÇÃO

Mundialmente, o choque séptico é uma das principais causas de óbito em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), correspondendo a 1 óbito em cada 4 pacientes críticos e por isso é considerado importante problema de saúde pública.<sup>1</sup>

A taxa de mortalidade do choque séptico varia de acordo com o país estudado. Na Europa e nos Estados Unidos a mortalidade varia de 30 a 50% dos casos.<sup>1</sup> No Brasil, segundo o Instituto Latino Americano de Sepse, a mortalidade foi de 65% em 2015.<sup>2</sup>

Apesar da elevada mortalidade, a incidência do choque séptico não é bem conhecida e, de maneira geral, os dados são altamente variáveis devido à diferença nos critérios diagnósticos utilizados e também limitada ao número de leitos de UTI disponíveis em cada país.<sup>3</sup>

Nos Estados Unidos, ocorrem cerca de 750.000 mil casos de choque séptico por ano, porém sabe-se que a sua incidência está aumentando e atualmente os custos para o seu tratamento atingem 20 bilhões de dólares/ano.<sup>1</sup> Dados epidemiológicos recentes estimam a ocorrência de sepse em UTI do Reino Unido e da França em 27,1% e 12,4% dos pacientes, respectivamente.<sup>3</sup>

Na América Latina, incluindo o Brasil, os dados sobre a prevalência e evolução da sepse em UTI são raros e pouco atuais, atingindo cerca de 27% no Brasil.<sup>4</sup> Entre os fatores responsáveis pelo aumento da prevalência destacam-se o envelhecimento da população, que apresentam maior número de comorbidades; maior sobrevida de pacientes imunossuprimidos e com doenças debilitantes; emprego mais frequente de técnicas invasivas (cateteres vesicais, tubos endotraqueais, cateteres intravasculares); aumento no número das infecções hospitalares e melhor reconhecimento da sepse.<sup>1</sup>

Durante alguns anos a sepse foi definida como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) associada à infecção presumida ou evidente.<sup>5</sup> A associação da sepse com hipoperfusão tecidual, que melhorava após adequada ressuscitação hemodinâmica, caracterizava a sepse grave.<sup>5</sup> Já o choque séptico era definido como quadro de sepse grave com manutenção da hipotensão apesar de adequada reposição volêmica e necessidade de drogas vasoconstritoras.<sup>5</sup>

Recentemente, foi publicada nova diretriz onde foram modificados os critérios diagnósticos.<sup>1</sup> O conceito sepse grave foi extinto e a SIRS considerada como resposta adaptativa à infecção.<sup>1</sup>

A sepse passou a ser definida como presença de disfunção orgânica, avaliado pela pontuação do escore SOFA (Sequential Organ Failure Assessment)  $\geq 2$  ou quick SOFA  $\geq 2$  e presença de infecção provável ou documentada.<sup>1</sup> O escore SOFA apresenta pontuação máxima de 24 pontos e avalia a disfunção de seis órgãos ou sistemas: respiratório (relação  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ), hematológico (plaquetas), hepático (bilirrubina), cardiovascular (pressão arterial média com ou sem uso de droga vasoativa), sistema nervoso central (escala de Glasgow) e renal (creatinina e débito urinário). O quick SOFA por sua vez avalia três parâmetros: alteração do estado mental, frequência respiratória  $\geq 22$  mpm e pressão arterial sistólica  $\leq 100$  mmHg.<sup>1</sup>

Já o choque séptico, passou a ser caracterizado pela presença de sepse com importantes anormalidades circulatórias, metabólicas e celulares capazes de aumentar drasticamente a mortalidade.<sup>1</sup> Clinicamente, os pacientes com choque séptico passaram a ser identificados pela presença de sepse associada ao lactato sérico acima de 2 mmol/L, hipotensão tecidual não responsiva à reposição de volume ( $\geq 30\text{mL/Kg/min}$ ) e necessidade de introdução de drogas vasopressoras para manutenção da pressão arterial média acima de 65mmHg.<sup>1</sup>

Atualmente, a sepse é vista como uma resposta do hospedeiro à infecção, em que mecanismos pró e antiinflamatórios podem contribuir tanto para a resolução da infecção e recuperação dos tecidos quanto para a lesão orgânica e infecções secundárias.<sup>6</sup> Além disso, a resposta à infecção é dependente do tipo de patógeno (carga e virulência) e do hospedeiro (características genéticas e presença de comorbidades).<sup>6</sup>

Durante a sepse ocorre a invasão do organismo por agentes infecciosos, que podem ser bactérias, vírus ou fungos. Os componentes da parede celular das bactérias gram-negativas e gram-positivas, além da infecção fúngica, são os principais ativadores da resposta inflamatória do hospedeiro, que apesar de importantes para destruir os microorganismos invasores, podem aumentar de forma descontrolada e evoluir para choque séptico.<sup>6</sup>

Podemos dividir em três alterações sistêmicas fundamentais observadas no choque séptico: alterações hemodinâmicas, microcirculatórias e disfunção mitocondrial.

As arteríolas e o endotélio vascular são os maiores responsáveis pelas alterações hemodinâmicas observadas no choque séptico. Primeiramente, ocorre vasodilatação intensa, em maior parte devido ao aumento na produção de óxido nítrico pelo endotélio vascular, à hiperpolarização das membranas das células musculares lisas das arteríolas e ao esgotamento dos estoques de vasopressina, liberada nas primeiras horas do choque.<sup>7</sup>

O óxido nítrico ativa o monofosfato de guanosina cíclico (GMP) e uma quinase responsável por desfosforilar a miosina das células musculares lisas das arteríolas e reduzir a contração muscular. A hiperpolarização da membrana promove a abertura dos canais de potássio ATP dependentes, com conseqüente eliminação deste para fora da célula, impedindo a abertura dos canais de cálcio responsáveis pela vasoconstrição.<sup>8</sup>

Além das alterações hemodinâmicas, é importante destacarmos as alterações microcirculatórias, que são independentes da pressão arterial e caracterizadas pela redução da densidade capilar, aumentando a distância para difusão de oxigênio para os tecidos.<sup>9</sup>

Uma das maiores causas atribuídas para as alterações na microcirculação é a disfunção endotelial. As células endoteliais quando ativadas pelas endotoxinas da membrana bacteriana e pelas citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8), adquirem função pró-coagulante e pró-trombótica.<sup>9</sup> A formação de trombos na microcirculação e a adesão de leucócitos no endotélio vascular levam ao estreitamento do vaso e a redistribuição do fluxo sanguíneo, contribuindo ainda mais para o agravamento da hipóxia tecidual.<sup>9</sup>

Em relação à disfunção mitocondrial, estudos experimentais e clínicos são controversos. Alguns estudos mostraram redução da atividade dos complexos mitocondriais e, mesmo com a oferta adequada de oxigênio, as células mantiveram o metabolismo anaeróbico.<sup>10</sup> Entretanto, essa disfunção depende do órgão estudado e parece ser uma alteração dinâmica ao longo do processo da sepse, sendo mais frequente nos pacientes que evoluem ao óbito.<sup>10</sup>

Concomitantemente a esses processos adaptativos, os patógenos invasores são também responsáveis por ativar a resposta imune inata através da interação com receptores que reconhecem estruturas conservadas nas espécies microbianas.<sup>6</sup> Esses receptores são o toll-like receptors (TLR), C-type lectin receptors (CLR), retinoic acid inducible gene 1-like receptors (RLR) e nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NLR).<sup>6</sup>

A ativação desses receptores desencadeia uma resposta pró-inflamatória que, se exagerada, pode levar a danos teciduais e necrose celular. Para atenuar esses efeitos o sistema imune ativa mecanismos celulares, humorais e neurais.<sup>6</sup> Os fagócitos, por exemplo, mudam para um fenótipo antiinflamatório que promove a reparação tecidual. Ocorre aumento da produção de células T reguladoras e células supressoras mielóides, que reduzem ainda mais a resposta inflamatória.<sup>6</sup>

Além disso, a ativação de mecanismos neurais pode inibir o processo inflamatório. Interessante destacarmos que pacientes que sobrevivem à fase inicial do choque séptico, mas que permanecem dependentes de cuidados intensivos, tem evidências de imunossupressão.<sup>6</sup>

Diante de todas as alterações observadas no choque séptico, a hipoperfusão tecidual pode ser considerada a mais grave por estar presente durante toda a evolução da doença e ser a maior causa de disfunção de múltiplos órgãos (DMO). Inicialmente a hipoperfusão ocorre em decorrência das alterações hemodinâmicas, principal responsável pela mortalidade precoce nos pacientes sépticos.<sup>11</sup> Posteriormente, a hipoperfusão ocorre devido às alterações mitocondriais e microcirculatórias<sup>11</sup> que levam à hipóxia tecidual em diversos órgãos e sistemas, com destaque para o comprometimento da função renal.

A lesão renal aguda (LRA) é complicação grave e frequente, com estimativa de desenvolvimento em cerca de 35% dos pacientes críticos e em até 60% dos pacientes sépticos.<sup>12</sup> Além de muito prevalente, a presença de sepse associada a LRA aumenta consideravelmente a morbimortalidade dos indivíduos.<sup>13,14</sup>

A LRA é uma síndrome clínica caracterizada pela redução abrupta da taxa de filtração glomerular (TFG), associada à retenção de produtos

nitrogenados do metabolismo como ureia e creatinina, distúrbios ácido-básicos, de fluídos e eletrólitos.<sup>12</sup>

De maneira geral, a hipoperfusão sistêmica presente no choque séptico é responsável pela isquemia renal, considerado um dos principais gatilhos para o desenvolvimento da LRA.<sup>13</sup> No entanto, devido à elevada incidência de LRA em pacientes sépticos, a hipoperfusão renal apesar de importante parece não ser um fator isolado.

A fisiopatologia da LRA induzida pela sepse é multifatorial e complexa, envolvendo mudanças na hemodinâmica renal, disfunção endotelial, infiltração de células inflamatórias no parênquima renal, trombose intraglomerular e congestão dos túbulos por necrose celular.<sup>15</sup>

Estudos experimentais e clínicos sugerem que, além da isquemia e inflamação, alguns mecanismos imunológicos também poderiam estar associados ao desenvolvimento da LRA na sepse.<sup>15</sup> Clinicamente, são conhecidos como fatores de risco para o desenvolvimento de LRA: presença de infecção não controlada, menor concentração sérica de hemácias e plaquetas, presença de doença renal crônica (DRC), redução da TFG e a idade.<sup>15</sup>

São conhecidas inúmeras definições diferentes para LRA, sendo o critério mais aplicado para o diagnóstico médico a elevação da creatinina sérica (aumento absoluto da creatinina superior a 0,3 mg/dl ou relativo de 50% do valor basal) e/ou detecção de oligúria (débito urinário inferior a 0,5 ml/kg/h por mais de 6 horas).<sup>16</sup> No entanto, a medida da creatinina sérica é considerada um teste limitado para a detecção dos estágios iniciais da LRA.<sup>12</sup>

Apesar de amplamente utilizado na prática clínica, a avaliação da creatinina sérica não é o melhor indicador de LRA, pois a sua elevação é considerada tardia, ocorrendo em até 72 horas após o insulto renal inicial.<sup>17</sup> Além disso, a creatinina sérica pode estar aumentada sem que ocorra lesão tubular propriamente dita pela presença de alguns fatores como o peso corporal, metabolismo muscular e uso de algumas medicações.<sup>17</sup>

A falta de marcadores capazes de detectar a lesão renal anteriormente à elevação da creatinina, associado ao quadro assintomático que muitos pacientes apresentam mesmo nos estágios avançados da doença, contribuem para a redução da eficácia do tratamento e consequente aumento da

mortalidade.<sup>12</sup> Diante do exposto, torna-se imprescindível a busca por novos biomarcadores para identificação da LRA nas fases iniciais em pacientes críticos.

Mais de 20 biomarcadores já foram estudados na LRA, em diversas situações clínicas, principalmente em pacientes sépticos.<sup>18</sup> Os marcadores mais citados na literatura são o NGAL (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin), IL-18 (Interleucina-18), KIM-1 (Kidney injury molecule-1) e cistatina-C.<sup>12</sup>

Entretanto, alguns desses marcadores podem ser influenciados por diversos fatores como função renal basal, gravidade da LRA, idade, inflamação sistêmica e infecção, sendo as duas últimas situações características nos pacientes com sepse.<sup>19</sup> Além disso, o NGAL, a IL-18 e a cistatina C urinários apresentam menor sensibilidade e especificidade em pacientes com DRC preexistente e em portadores de outras comorbidades.<sup>19-21</sup>

De maneira ideal, o melhor biomarcador seria aquele capaz de detectar precocemente a lesão renal, de fácil mensuração e que não sofresse a interferência de outras variáveis biológicas. Associada a importante influência exercida por essas variáveis, outra barreira para a descoberta de novos biomarcadores específicos é a compreensão insuficiente da fisiopatologia da sepse induzindo a LRA. Nos últimos anos, o estresse oxidativo vem ganhando destaque e seu estudo pode contribuir para a melhor compreensão da LRA séptica e para descoberta de novos biomarcadores.<sup>22</sup>

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio no balanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e as defesas antioxidantes do organismo.<sup>23</sup> Tanto as EROs quanto as ERNs possuem importantes papéis fisiológicos na modulação da sinalização, proliferação, apoptose e proteção celular.<sup>23</sup> Nos últimos anos, diversos estudos tem evidenciado o aumento da produção de EROs e ERNs na sepse.<sup>23-25</sup> Quando em excesso, EROs e ERNs também são capazes de lesar proteínas, polissacarídeos, ácidos nucléicos e ácidos graxos poliinsaturados, resultando em dano ou morte celular e disfunção dos tecidos.<sup>23</sup> Em pacientes críticos, EROs podem ser produzidas principalmente a partir da disfunção mitocondrial, endotelial e da ativação da enzima NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) oxidase, como é classicamente observado no choque séptico.<sup>23</sup> Ademais, EROs podem estimular a liberação de citocinas e a expressão de moléculas de

adesão, levando a infiltração de granulócitos nos tecidos. Os granulócitos por sua vez também aumentam a geração de EROs e amplificam a resposta inflamatória e a lesão tecidual subsequente.<sup>25</sup>

Para avaliação do estresse oxidativo ainda não existe consenso sobre qual método é o padrão ouro. Entretanto, no que se refere à peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA) é o marcador mais amplamente utilizado para a determinação do estresse oxidativo em humanos.<sup>26</sup> O MDA é um aldeído de baixo peso molecular formado a partir da degradação da membrana fosfolipídica celular pela agressão das EROs, principalmente do radical hidroxil.<sup>27</sup> Sua concentração acima dos valores de normalidade tem sido associada a maior gravidade e menor sobrevida em pacientes sépticos.<sup>27</sup>

Por outro lado, existe complexo sistema de defesa endógeno designado para proteger os tecidos da lesão celular induzida por EROs. Esse sistema antioxidante pode ser dividido em enzimático, onde se destacam enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase e a tioredoxina; não enzimático hidrofílico, composto por proteínas, ácido úrico, ácido ascórbico, selênio e zinco; e não enzimático lipofílico, em que se destaca o  $\alpha$ -tocoferol.<sup>28</sup> Em pacientes críticos há redução dos estoques antioxidantes, redução das concentrações intracelulares e plasmáticas de co-fatores e diminuição da atividade dos sistemas enzimáticos envolvidos na desintoxicação das EROs.<sup>29</sup> Dentre as enzimas antioxidantes a SOD merece destaque.

A SOD é uma das principais enzimas antioxidantes e consiste em três classes de enzimas: cobre/zinco SOD (CuZn-SOD, SOD1), que está localizada no citosol, núcleo e espaço intermembrana da mitocôndria; manganês SOD (Mn-SOD, SOD2), encontrada na matrix mitocondrial; e a ferro SOD (Fe-SOD, SOD3), localizada no meio extracelular.<sup>28</sup>

A SOD1 é o membro mais abundante dessa família de enzimas antioxidantes, representando cerca de 90% do total de SODs.<sup>28</sup> Além disso, é considerada a primeira linha de defesa do sistema antioxidante contra as EROs. Tem como função catalisar a conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, que ao final é dissociado em água e oxigênio pelas enzimas glutathione peroxidase e catalase, transformando assim uma espécie altamente reativa em uma forma menos nociva às células.<sup>28</sup>

Por serem consideradas cofatores da SOD1, as concentrações corporais de zinco e cobre podem interferir na atividade desta enzima. Pacientes críticos podem apresentar baixa concentração plasmática de zinco como resultado da redistribuição do compartimento vascular e aumento da sua excreção.<sup>29</sup> Baixas concentrações do mineral estão associados com a gravidade da doença e com a intensidade da resposta inflamatória sistêmica.<sup>30,31</sup>

Na circulação sanguínea, cerca de 95% do cobre é encontrado na forma de ceruloplasmina.<sup>32</sup> Esta é uma proteína de fase aguda, que está aumentada na inflamação e, como resultado, os níveis plasmáticos de cobre estão frequentemente elevados em pacientes críticos.<sup>33</sup>

Devido as alterações esperadas nas concentrações dos minerais citados, torna-se difícil quantificar os seus reais estoques em pacientes graves, pois parece haver importante redistribuição fisiológica, induzida principalmente pelo endotélio vascular e pela inflamação, e não necessariamente presença de déficit ou excesso dos mesmos. Além do mais, os eventos são simultâneos e a presença tanto do estresse oxidativo, quanto da concentração e utilização dos minerais poderiam interferir na atividade da SOD1 em pacientes críticos.

Os dados na literatura são escassos e não existem estudos que avaliaram a atividade eritrocitária da SOD1 em pacientes críticos, nem tampouco na população de indivíduos com choque séptico e LRA. Alguns dados podem ser extrapolados baseados nos resultados de estudos experimentais e clínicos conduzidos na DRC, onde mostraram que as concentrações da SOD1 foram reduzidas e os marcadores de dano oxidativo foram aumentados nesse cenário.<sup>26,34,35</sup> Além disso, algumas estratégias tem sido adotadas para aumentar a atividade SOD1, como o uso de moléculas recombinantes da SOD1 e a transferência de genes, levando à redução da inflamação e do estresse oxidativo em modelos experimentais de LRA induzida por isquemia-reperfusão e por uso de contraste.<sup>36-38</sup> Também é interessante observar que em pacientes submetidos a transplante renal, as concentrações de MDA foram preditoras de perda do enxerto.<sup>39,40</sup> Apesar da importância do estresse oxidativo tanto na fisiopatologia da sepse quanto da LRA, a atividade da SOD1 ainda não foi avaliada como biomarcador do desenvolvimento de LRA em pacientes com choque séptico.

**HIPÓTESE**

Formulamos a hipótese de que a sepse levaria à redução da atividade da SOD1 no eritrócito, favorecendo o aumento do estresse oxidativo no organismo e conseqüentemente o desenvolvimento da LRA em pacientes com choque séptico. Logo, a atividade da SOD1 no eritrócito poderia ser um marcador de LRA.

**OBJETIVO**

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade eritrocitária da SOD1 como biomarcador do desenvolvimento de LRA em pacientes com choque séptico.

# **CASUÍSTICA E MÉTODOS**

## **Delineamento**

A pesquisa foi iniciada somente após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa de seres humanos da nossa instituição sob protocolo nº 30457414.7.0000.5411. O termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os pacientes ou de seus familiares antes da sua inclusão no estudo.

Trata-se de um estudo clínico observacional prospectivo, conduzido de maio de 2014 a junho de 2015. Foram avaliados pacientes com choque séptico admitidos no Serviço de Terapia Intensiva (SETI) ou no Centro de Terapia Intensiva (CTI) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC/FMB), totalizando 28 leitos de internação.

O tamanho amostral foi calculado usando a fórmula de Fisher e Belle<sup>41</sup>, com as seguintes variáveis: taxa de mortalidade do choque séptico de 40 - 60%, intervalo de confiança de 95% e erro amostral de 10%. O tamanho amostral mínimo foi de 96 pacientes.

Foram incluídos no estudo todos os indivíduos maiores de 18 anos, de ambos os sexos, com o diagnóstico de choque séptico na admissão na UTI e com uso de droga vasoativa por tempo superior a 24 horas. Os critérios de exclusão foram: pacientes com LRA na admissão na UTI, pacientes com DRC estágios 4 ou 5 (clearance de creatinina menor que 30 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>), atraso no diagnóstico de choque séptico (tempo superior a 24 horas), gestantes, dose de noradrenalina  $\geq 2,0\mu\text{g/Kg/min}$ , pacientes com morte encefálica confirmada, pacientes em cuidados paliativos e associação de outros tipos de choque (cardiogênico, hemorrágico ou hipovolêmico).

Na admissão dos pacientes foram registrados os dados demográficos, clínicos, os escores de gravidade (APACHE II - "Acute Physiology and Chronic Health Evaluation" e SOFA) e os exames bioquímicos. Amostras de sangue foram coletadas dentro das primeiras 24 horas da admissão dos pacientes na UTI, após a estabilização hemodinâmica, para avaliação da atividade eritrocitária da SOD1 e concentração sérica do MDA. Todos os pacientes foram acompanhados ao longo da sua permanência na UTI e o desenvolvimento da LRA foi avaliado durante esse

período. A taxa de mortalidade e o tempo de internação na UTI também foram registrados.

O choque séptico foi definido por pressão arterial sistólica < 90 mmHg ou pressão arterial média < 70 mmHg apesar de reposição volêmica intensa (infusão de cristalóide  $\geq$  30ml/Kg/h), com infecção provável ou documentada e necessidade de utilização de droga vasopressora.<sup>5</sup> A LRA foi definida conforme os critérios do KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes), sendo eles: aumento na creatinina sérica  $\geq$  0,3mg/dL no intervalo de 48 horas ou aumento na creatinina sérica  $\geq$  50% do valor basal.<sup>16</sup> A creatinina basal foi atribuída como o menor valor de creatinina nos 6 meses anteriores ao desenvolvimento da LRA ou, para os pacientes que não tinham essa medida, foi considerado o menor valor de creatinina atingido durante a internação na ausência de diálise. A DRC foi definida como clearance de creatinina menor que 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> por um período mínimo de 3 meses.

Além disso, foram incluídos 17 indivíduos controles (indivíduos não hospitalizados e sem qualquer tipo de doença aguda). Estes foram coletados no setor de doação de sangue do Hemocentro do HC/FMB ou em Instituição de Longa Permanência, ambos na cidade de Botucatu. Todos os participantes do grupo controle foram devidamente orientados em relação aos objetivos da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

### **Coleta de Materiais Biológicos**

Aproximadamente 10 mL de sangue foram coletados de cada paciente em até 24 horas de sua internação na UTI. Cerca de 5 mL de sangue total foram transferidos para tubos sem anticoagulante para obtenção do soro e 5mL para tubos com anticoagulante EDTA para obtenção dos eritrócitos.

O soro foi obtido por centrifugação dos tubos em temperatura ambiente a 3000 x g durante 15 minutos. Após esse procedimento, as amostras foram identificadas e acondicionadas em tubos de polipropileno, sendo a seguir armazenados a -80°C.

A separação dos eritrócitos seguiu método já padronizado na literatura.<sup>42</sup> Primeiro, o plasma foi separado do sangue total por centrifugação em 3000 x g durante 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. Em seguida, a massa eritrocitária obtida do sangue total foi lavada 3 vezes com 5 mL de solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%. Estas eram homogeneizadas lentamente por inversão e centrifugadas em 10000 x g durante 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante desprezado. Após a última centrifugação, a solução fisiológica era descartada e os eritrócitos cuidadosamente extraídos e transferidos para tubos de polipropileno e armazenados a -80°C.

### **Análises laboratoriais**

A análise laboratorial referente à atividade eritrocitária da SOD1 foi realizada no Laboratório de Nutrição e Minerais do Departamento de Alimentos e Nutrição experimental - USP/São Paulo. A análise da concentração de MDA foi realizada na Unidade de Pesquisa Experimental - UNESP/Botucatu. Já os exames bioquímicos, foram realizados no laboratório clínico do HC/FMB.

### **Determinação da atividade eritrocitária da SOD1**

As enzimas antioxidantes em geral estão presentes predominantemente no meio intracelular, sendo amplamente utilizado os eritrócitos para a sua análise, pois apresentam meia vida de 120 dias.<sup>43,44</sup>

Neste estudo, a determinação da atividade da enzima SOD1 foi feita nos eritrócitos, utilizando-se o kit comercial Ransod; Randox®, conforme metodologia recomendada pelo fabricante. Esta análise foi constituída por duas etapas, sendo primeiro adicionado 100µL da amostra de massa eritrocitária em um tubo contendo 900µL de solução tampão fosfato (lisado 1). Posteriormente, 100µL da solução do lisado 1 foi adicionada em um outro tubo contendo 2900µL de tampão fosfato, com volume total de 3mL, obtendo-se o lisado 2 e fator de diluição total de 300. Em seguida, foi realizada a leitura das amostras, utilizando-

se o analisador bioquímico Lyasis® e o resultado obtido corrigido pela concentração de hemoglobina.

Paralelamente a este processo, foi feita a dosagem da hemoglobina pelo método de cianometahemoglobina. Neste processo, 50 µL do eritrócito foram diluídos em 50 µL de água deionizada (lisado 1). Em seguida, três alíquotas de 10 µL do lisado 1 foram diluídas em 5mL de solução de Drabkin, com proteção da luz e imediatamente lido em espectrofotômetro UV visível Genesys® 20, em comprimento de onda de 540nm. A concentração de hemoglobina do hemolisado foi determinada para que o resultado final fosse expresso em unidades de enzima por miligrama de hemoglobina (U/mg Hb).

### **Concentração de MDA no soro**

A concentração de MDA no soro foi realizada com base na reação com o ácido tiobarbitúrico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de acordo com o método estabelecido na literatura.<sup>45</sup> A detecção por UV foi efetuada a 532 nm e os resultados expressos em µmol/L.

### **Exames bioquímicos**

Os exames bioquímicos foram realizados na admissão do paciente na UTI. Foram realizados os seguintes exames: sódio, potássio, fósforo, ureia, creatinina, proteína C reativa e albumina (método e química seca - Ortho-Clinical Diagnostics VITROS 950®, Johnson & Johnson); hemograma completo (método de automação em auto-analisador Coulter STKS) e lactato (Roche OMNI® S Blood Gas Analyzer).

### **Análise estatística**

Os dados foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão, em mediana (incluindo o menor e maior quartil) ou porcentagem.

Para comparação entre dois grupos, foi utilizado o teste *t* de Student quando as variáveis contínuas apresentaram distribuição normal e o teste de Mann-Whitney quando tiveram distribuição não normal.

Também para comparação entre dois grupos, mas com variáveis categóricas, foi utilizado o teste de Chi-quadrado ou o teste exato de Fisher. Comparações entre variáveis contínuas foram realizadas usando a correlação de Spearman.

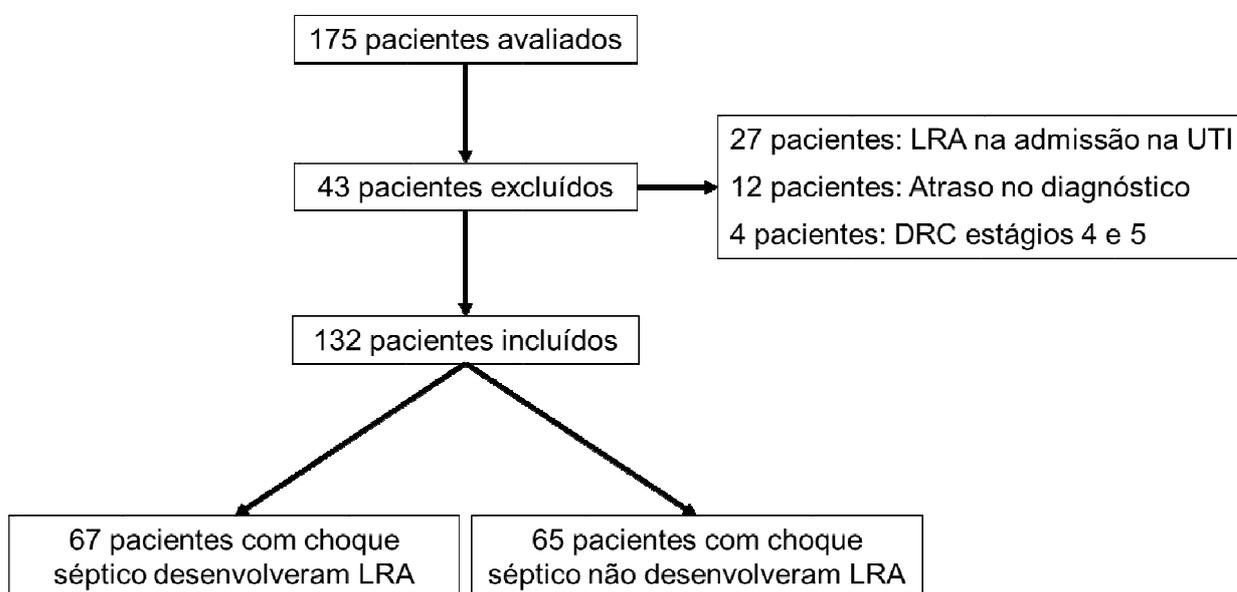
A análise da curva ROC (Receiver Operating Characteristic) foi construída para avaliar o desempenho da atividade eritrocitária da SOD1 em prever o desenvolvimento da LRA. A atividade eritrocitária da SOD1 foi testada como variável categórica (> 3,32 U/mg Hb, ponto de corte obtido pela curva ROC). Foram construídos dois modelos de regressão logística para prever o desenvolvimento da LRA. No primeiro modelo, a atividade eritrocitária da SOD1 foi ajustada pelos parâmetros que exibiram diferença significativa nas análises univariadas. As únicas exceções foram as variáveis que apresentaram elevada colinearidade entre elas (ureia, creatinina, potássio, MDA, DRC e escore SOFA). No outro modelo, a variável SOD1 foi ajustada por idade, gênero, DRC, categoria da admissão (clínica ou cirúrgica) e escore APACHE II.

As análises dos dados foram realizadas usando o software SigmaPlot para Windows v12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). O nível de significância adotado foi de 5%.

# RESULTADOS

## 1. Composição dos grupos e características clínicas dos pacientes

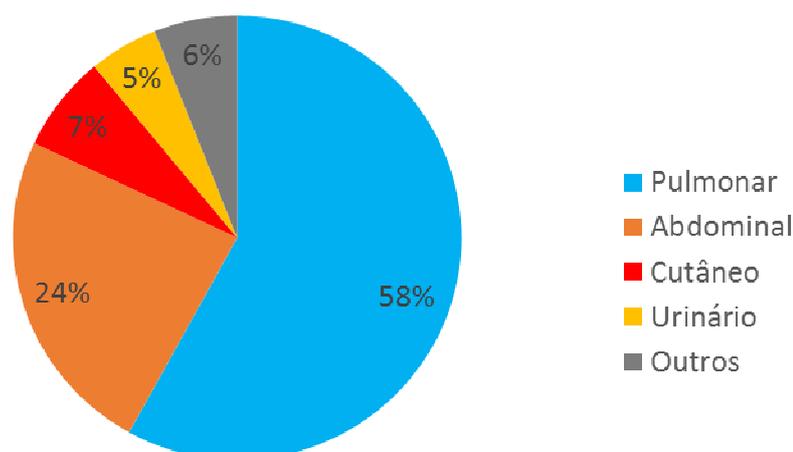
Durante a pesquisa, foram avaliados prospectivamente 175 pacientes com o diagnóstico de choque séptico admitidos na UTI. Entretanto, 43 pacientes foram excluídos, sendo 27 pacientes devido à presença de LRA na admissão na UTI; 12 pacientes por atraso no diagnóstico de choque séptico e 4 pacientes portadores de DRC avançada. Dessa maneira, foram avaliados e incluídos no estudo 132 pacientes com choque séptico, destes 67 (51%) desenvolveram LRA durante a internação na UTI (Figura 1).



**Figura 1.** Número de pacientes incluídos no estudo.

Os pacientes tiveram média de idade de  $63,2 \pm 15,7$  anos e 53% eram do gênero masculino. A mediana do tempo de internação e a taxa de mortalidade na UTI foram de 8 (4 - 16) dias e 66% respectivamente.

Em relação à causa da sepse, 58% dos pacientes apresentaram infecção de foco pulmonar, 24% de foco abdominal, 7% de foco cutâneo, 5% de foco urinário e 6% de outros focos (Figura 2).



**Figura 2.** Distribuição dos tipos de foco de infecção.

Os pacientes com sepse e os indivíduos controle foram semelhantes em relação à idade e ao sexo. Como esperado, o grupo séptico apresentou maior estresse oxidativo, caracterizado pela maior concentração sérica do MDA associado a menor atividade eritrocitária da SOD1 (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características demográficas e laboratoriais dos grupos sepse e controle.

Variável	Grupos		Valor referência	Valor de p
	Sepse (n = 132)	Controle (n = 17)		
Idade, (anos)	66 (55 – 73)	60 (54 – 80)	-	0,756
Homens, n (%)	70 (53%)	10 (59%)	-	0,847
SOD1 (U/mg Hb)	2,9 (2,2 – 3,9)	4,4 (3,3 – 4,7)	1,1 – 1,6	<b>0,001</b>
MDA ( $\mu\text{mol/L}$ )	1,4 (0,8 – 2,2)	0,8 (0,5 – 1,1)	0,36 – 1,24	<b>0,003</b>

SOD1: superóxido dismutase 1; MDA: malondialdeído. Dados foram expressos como mediana (incluindo o menor e maior quartil) ou porcentagem. Foram utilizados os testes t de Student, Mann-Whitney, Chi-quadrado ou exato de Fisher.

## 2. Desenvolvimento da lesão renal aguda

Entre os pacientes com choque séptico, 67 (51%) desenvolveram LRA durante a internação na UTI. Em relação à gravidade da LRA segundo os estágios

do KDIGO<sup>16</sup>, 17,9% dos pacientes foram classificados como KDIGO 1, 19,4% como KDIGO 2 e 62,7% como KDIGO 3, sendo considerada a classificação 3 a de maior gravidade. O intervalo de tempo para o diagnóstico da LRA foi de 2,3 dias após a admissão dos pacientes na UTI.

Os dados demográficos e clínicos de acordo com o desenvolvimento da LRA estão sumarizados na Tabela 2. Não houve diferença entre os grupos em relação ao sexo e a idade. Entre os pacientes que desenvolveram LRA, 18% necessitaram de tratamento dialítico durante a permanência na UTI e 85,1% tinham DRC em estágios 1 a 3. Os escores de gravidade APACHE II e SOFA foram maiores nos pacientes com LRA, com aumento da taxa de mortalidade (77,6%) quando comparado aos pacientes sem LRA (53,8%). Além de mais graves, boa parcela dos pacientes que desenvolveram LRA receberam transfusão de sangue (53,7%), fizeram uso de corticóides (56,7%), tiveram como principal foco de infecção o pulmonar (62,7%), necessitaram de suporte ventilatório durante a internação (89,6%) e foram de especialidades cirúrgicas (73,1%). Apesar de prevalentes, estas variáveis não foram estatisticamente diferentes dos pacientes sem LRA. Além disso, pela maior gravidade demonstrada pelos escores de gravidade e pela taxa de mortalidade, os pacientes com LRA tiveram menor tempo de internação na UTI e no hospital, mas sem diferença estatística.

**Tabela 2.** Dados demográficos e clínicos de 132 pacientes com choque séptico.

Variável	Lesão Renal Aguda		Valor de P
	Sim (n = 67)	Não (n = 65)	
Idade, (anos)	67,0 (59,0 – 75,0)	64,0 (50,5 – 72,5)	0,201
Homens, n° (%)	35 (52,2)	35 (53,8)	0,992
APACHE II	18,7 ± 6,0	16,0 ± 6,4	<b>0,011</b>
SOFA	10,0 (8,0 – 12,0)	8,0 (7,0 – 9,5)	<b>&lt;0,001</b>
Transfusão sangue, n° (%)	36 (53,7%)	29 (44,6)	0,380
Corticóides, n° (%)	38 (56,7%)	30 (46,2%)	0,300
Categoria admissão, n° (%)			0,110
Clínico	18 (26,9%)	27 (41,5%)	
Cirurgico	49 (73,1%)	38 (58,5%)	
Foco infecção, n° (%)			0,464
Pulmonar	42 (62,7)	34 (52,3)	
Abdominal	16 (23,8)	16 (24,6)	
Urinário	3 (4,5)	4 (6,2)	
Outros	6 (9,0)	11 (16,9)	
Diálise, n° (%)	12 (18)	0 (0)	<b>0,001</b>
DRC, n° (%)	57 (85,1%)	7 (10,8%)	<b>&lt;0,001</b>
VM, n° (%)	60 (89,6)	55 (84,6)	0,557
Tempo UTI (dias)	7,0 (5,0 – 15,0)	9,0 (4,0 – 16,5)	0,634
Tempo internação (dias)	16 (9 - 25)	21 (12 – 32)	0,067
Mortalidade UTI, n° (%)	52,0 (77,6)	35,0 (53,8)	<b>0,007</b>

APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; DRC: Doença Renal Crônica; VM: Ventilação Mecânica; UTI: Unidade de Terapia Intensiva. Dados foram expressos como média ± desvio padrão, mediana (incluindo o menor e maior quartil) ou porcentagem. Foram utilizados os testes t de Student, Mann-Whitney, Chi-quadrado ou exato de Fisher.

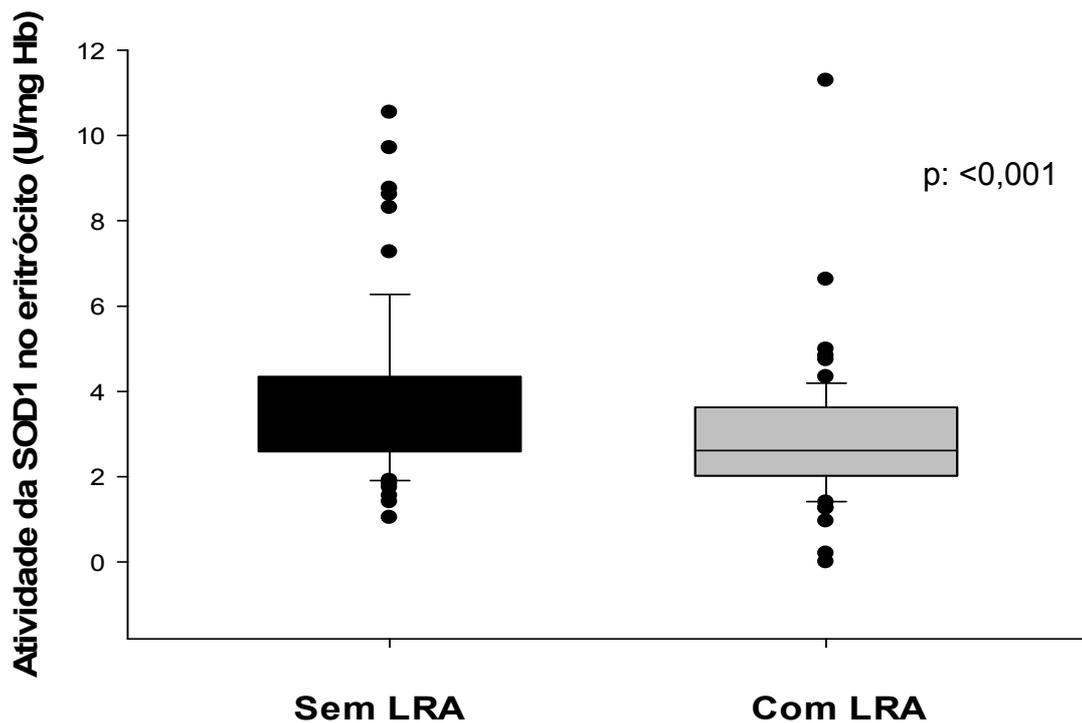
As informações referentes aos exames laboratoriais estão apresentados na Tabela 3. Os pacientes que desenvolveram LRA tiveram maior concentração sérica de potássio, fósforo, ureia, creatinina e MDA e menor concentração de hemoglobina e atividade da SOD1 quando comparado aos indivíduos que não desenvolveram LRA. Não houve diferença estatística para os demais exames bioquímicos.

**Tabela 3.** Dados laboratoriais de 132 pacientes com choque séptico.

Variável	Lesão Renal Aguda		Valor de p
	Sim (n = 67)	Não (n = 65)	
Lactato (mmol/L)	2,2 (1,4 – 3,5)	2,1 (1,2 – 3,4)	0,782
Hemoglobina (g/dL)	11,0 (9,1 – 12,0)	11,6 (10,0 – 12,7)	<b>0,025</b>
Hematócrito (%)	32,0 ± 6,4	34,1 ± 5,7	0,056
Leucócitos (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	16,6 (12,2 – 21,6)	16,3 (12,2 – 24,0)	0,891
Na (mmol/L)	145 (140 -149)	141 (137– 149)	0,212
K (mmol/L)	4,5 ± 0,9	4,1 ± 0,7	<b>0,013</b>
P (mg/dL)	4,7 (3,4 – 6,6)	3,9 (2,7 – 4,9)	<b>0,004</b>
Glicemia (mg/dL)	145 (118 -186)	146 (115 – 184)	0,871
PCR (mg/dL)	36,0 (28,0 – 44,1)	32,0 (8,5 – 41,5)	0,073
Albumina (g/dL)	2,3 (2,0 – 2,5)	2,1 (1,8 – 2,8)	0,606
Ureia (mg/dL)	95 (67 – 159)	53 (32 – 87)	<b>&lt;0,001</b>
Creatinina (mg/dL)	2,1 (1,6 – 2,6)	0,7 (0,5 – 1,1)	<b>&lt;0,001</b>
SOD1 (U/mg Hb)	2,6 (2,0 – 3,6)	3,6 (2,6 – 4,3)	<b>&lt;0,001</b>
MDA (µmol/L)	1,6 (1,0 – 2,5)	1,3 (0,6 - 2,0)	<b>0,009</b>

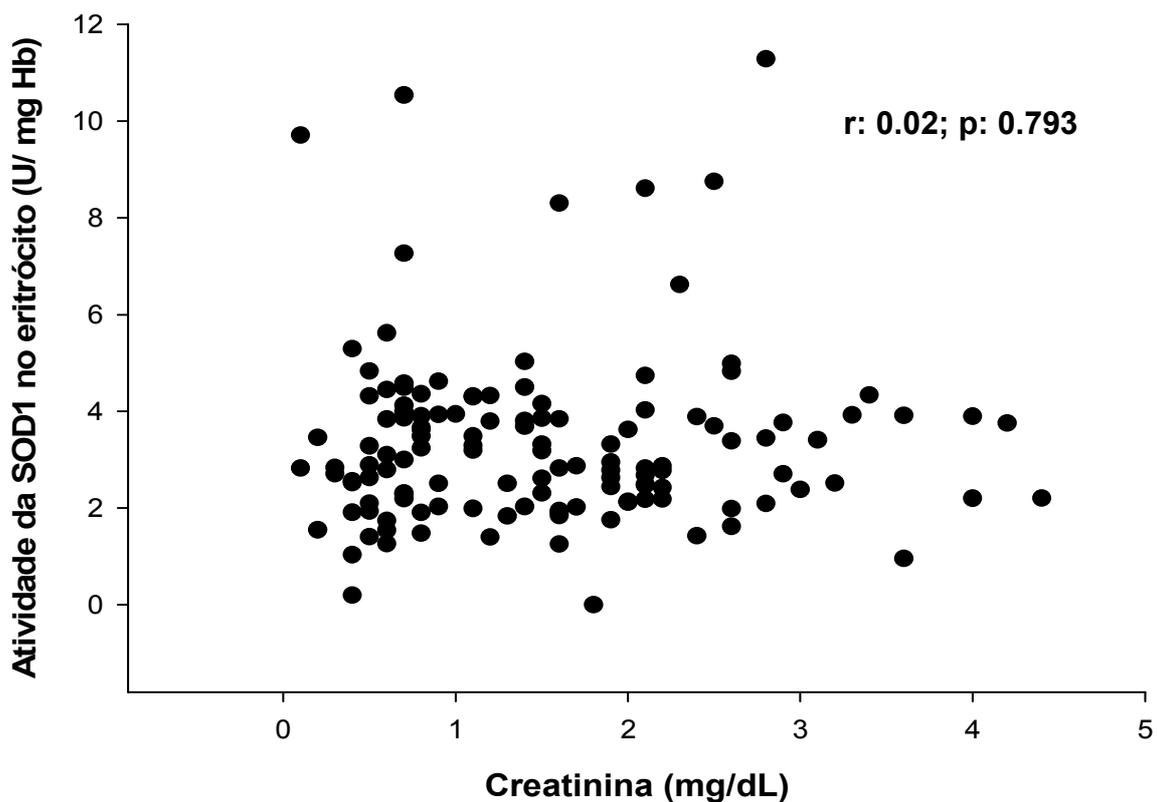
Na: sódio; K: potássio; P: fósforo; PCR: proteína C reativa; SOD1: superóxido dismutase 1; MDA: malondialdeído. Dados foram expressos como média ± desvio padrão e mediana (incluindo o menor e maior quartil). Foram utilizados os testes t de Student ou Mann-Whitney.

A atividade eritrocitária da SOD1 foi menor nos pacientes que desenvolveram LRA (sem LRA: 3,6 (2,6 – 4,3) vs LRA: 2,6 (2,0 – 3,6) U/mg Hb; p: <0,001) (Figura 3).



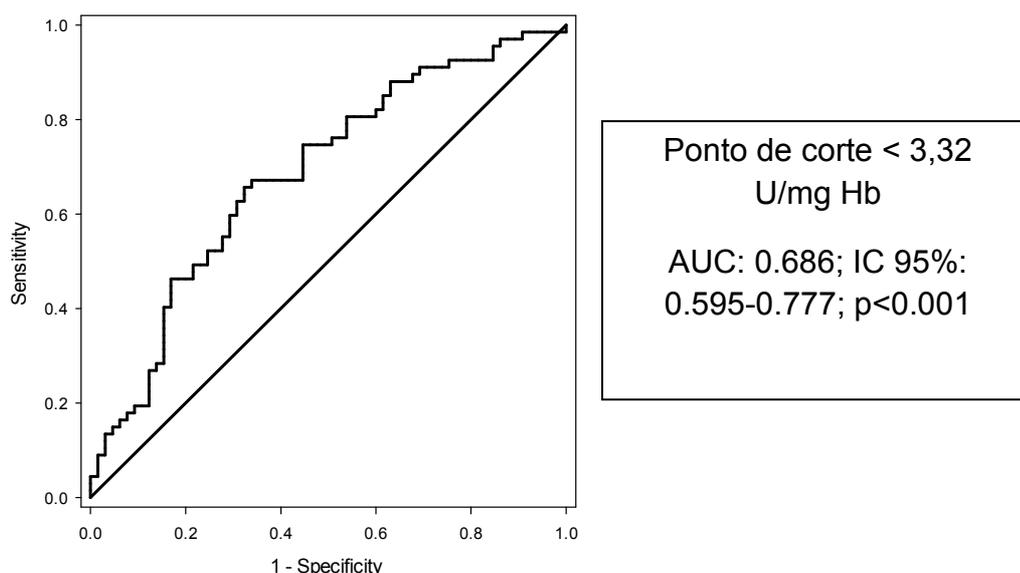
**Figura 3.** Atividade da superóxido dismutase em pacientes com choque séptico.

Torna-se relevante destacarmos que embora a concentração de creatinina na admissão na UTI tenha sido maior nos pacientes que desenvolveram LRA, a atividade eritrocitária da SOD1 não esteve relacionada com a creatinina sérica na admissão na UTI (Figura 4).



**Figura 4.** Correlação da creatinina sérica da admissão na UTI com a atividade eritrocitária da SOD1.

A análise da curva ROC demonstrou que a menor atividade eritrocitária da SOD1 foi associada com o desenvolvimento de LRA (AUC: 0,686; IC 95%: 0,595-0,777;  $p < 0,001$ ) no ponto de corte inferior a 3,32 U/mgHb [sensibilidade: 68,7% (IC 95%: 57,6-79,8%); especificidade: 55,4% (IC 95%: 43,3-67,5%); valor preditivo positivo: 61,3% (IC 95%: 50,3-72,3%); valor preditivo negativo: 63,2% (IC 95%: 50,7-75,7%)] (Figura 5).



**Figura 5.** Curva ROC da atividade eritrocitária da SOD1 e o desenvolvimento de LRA.

No modelo de regressão logística (Tabela 4), a atividade da SOD1 maior que 3,32 U/mg Hb foi associada com proteção para o desenvolvimento da LRA quando ajustada pela hemoglobina, fósforo e escore APACHE II (OR: 0,309; IC 95%: 0,137-0,695; p:0,005). E também quando ajustado pela idade, gênero, DRC, categoria da admissão (clínico ou cirúrgico) e escore APACHE II (OR: 0,129; IC 95%: 0,033-0,508; p: 0,003).

**Tabela 4.** Modelo de regressão logística para a predição de lesão renal aguda em 132 pacientes com choque séptico.

Variável	OR	IC 5 – 95%	Valor de p
SOD 1 (U/mg Hb)*	0,326	0,158 – 0,671	<b>0,002</b>
SOD 1 (U/mg Hb)**	0,309	0,137 – 0,695	<b>0,005</b>
SOD 1 (U/mg Hb)***	0,129	0,033 – 0,508	<b>0,003</b>

SOD1: superóxido dismutase 1. \* Não ajustado; \*\*Ajustado por hemoglobina, fósforo e APACHE II; \*\*\* Ajustado por idade, gênero, DRC, categoria da admissão e APACHE II.

**DISCUSSÃO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade eritrocitária da SOD1 como marcador de LRA em pacientes com choque séptico. Este estudo mostrou pela primeira vez na literatura que em pacientes com choque séptico a atividade eritrocitária da SOD1 é um biomarcador precoce do desenvolvimento de LRA.

Apesar da criação de diretrizes internacionais para o diagnóstico precoce e o tratamento adequado do choque séptico, as taxas de mortalidade continuam elevadas, cerca de 30 a 65% da população acometida.<sup>1,2</sup>

No nosso estudo, 66% dos pacientes com choque séptico evoluíram ao óbito, taxa superior ao encontrado em estudo prévio, onde a mortalidade foi observada em 54,5% dos pacientes.<sup>46</sup> Apesar de muito elevada, nossas taxas, infelizmente, estão de acordo com os dados encontrados na literatura.<sup>1,2</sup>

Os fatores determinantes para a pior evolução dos pacientes não são completamente esclarecidos. Entretanto, acredita-se que além do perfil do agente infeccioso, a modulação da resposta pró e anti-inflamatória decorrentes das características individuais do hospedeiro sejam também fundamentais.<sup>2</sup>

De maneira mais agravante, nos pacientes que desenvolveram LRA a mortalidade foi ainda maior, representando 77,6% dos casos. A LRA é complicação frequente em pacientes com sepse e está associada com desfechos adversos incluindo o aumento do tempo de internação, desenvolvimento de DRC e aumento no risco de óbito.<sup>47,48</sup>

Como condições que favorecem o aumento da mortalidade na LRA podemos citar a oligúria e a necessidade de ressuscitação volêmica, situações que levam à sobrecarga de volume, acidose e distúrbios eletrolíticos.<sup>49</sup> A resposta inflamatória desencadeada pela LRA, pode levar a desordens sistêmicas, como a síndrome do desconforto respiratório agudo.<sup>50</sup> Semelhante a DRC, é provável que toxinas urêmicas presentes na LRA possam prejudicar a imunidade e aumentar as taxas de infecção.<sup>51</sup> A terapia de suporte renal não reverte completamente os riscos associados a LRA.<sup>51</sup> E, finalmente, a dose de vários medicamentos quando ajustada pela função renal de forma incorreta pode levar à falhas no tratamento e efeitos adversos.<sup>52</sup>

Neste estudo, os pacientes com LRA tiveram maior mortalidade porque foram mais graves. Fato demonstrado pelo maior escore de gravidade

APACHE II, maior escore de disfunção de múltiplos órgãos SOFA e maior frequência da classificação de lesão renal KDIGO 3, considerada a mais grave.

Esses dados sugerem que apesar do tratamento considerado adequado, no momento da identificação da LRA, o organismo já apresentava repercussões sistêmicas graves e de difícil resolução. Assim, tão importante quanto a aplicação do tratamento eficaz, é necessário o diagnóstico cada vez mais precoce da LRA para a redução da morbimortalidade.

Vários estudos foram realizados em diferentes situações clínicas para identificar biomarcadores preditores de LRA, principalmente em pacientes críticos.<sup>18,53</sup>

A lesão renal inicia-se através da indução de alterações biológicas e moleculares que podem evoluir para danos celulares, permitindo dessa forma o uso de diversos biomarcadores para a sua identificação.<sup>54</sup> Como definição, o biomarcador pode corresponder a um parâmetro de alteração estrutural, bioquímico ou genético capaz de indicar a presença, gravidade ou o progresso de determinada doença.<sup>54</sup>

Geralmente, a função renal é avaliada pela concentração de creatinina sérica, redução da TFG e pelo débito urinário.<sup>16</sup> No entanto, estes marcadores subestimam a detecção da LRA nos estágios iniciais e apresentam baixa sensibilidade e especificidade em pacientes com LRA associada a sepse.<sup>17,55</sup>

A sepse em si é responsável por diminuir a produção de creatinina e a sobrecarga de volume que alguns pacientes com choque podem receber contribuem para o atraso na elevação desta.<sup>55</sup> O débito urinário é também influenciado por diversos fatores confundidores, uma vez que a rápida redução no débito pode ser considerada uma alteração subclínica da LRA, sem associação com a redução da TFG e presença de lesão do parênquima renal propriamente dito.<sup>55</sup>

Por outro lado, existem algumas dificuldades para a interpretação dos novos biomarcadores para a identificação mais precoce da LRA. Uma delas é a distinção entre LRA e DRC, pois ambas as doenças compartilham semelhante fisiopatologia e a presença de uma aumenta o risco de desenvolvimento da outra.<sup>17</sup> Além disso, esses biomarcadores são sempre comparados com os critérios

considerados falhos na identificação precoce da LRA mencionados acima e alguns deles são influenciados também pelo estado inflamatório da sepse.<sup>55</sup>

No entanto, apesar dessas limitações, vários estudos têm demonstrado melhora substancial do diagnóstico utilizando diferentes moléculas como o NGAL, a IL-18, a cistatina C e o KIM-1.<sup>54</sup>

O NGAL é considerado marcador precoce de LRA em diversas situações clínicas, sendo extensivamente estudado em pacientes com sepse e está aumentado tanto no plasma quanto na urina durante a evolução da lesão renal.<sup>53</sup> Porém, uma das limitações para o uso do NGAL é que o seu aumento pode ser causado pela inflamação induzida pela sepse e não somente pelo desenvolvimento da LRA.<sup>55</sup> Estudos sugerem que o NGAL tanto no plasma quanto na urina está mais associado com a gravidade da sepse e a presença de DMO do que com a incidência de LRA.<sup>55</sup>

Além disso, o NGAL, a IL-18 e a cistatina C urinários apresentam menor sensibilidade e especificidade em pacientes com DRC preexistente e em portadores de outras comorbidades.<sup>19-21</sup>

O principal achado do nosso trabalho foi que além de, pela primeira vez na literatura, a atividade da SOD1 ter sido relacionada com a predição precoce de LRA, os nossos resultados não sofreram a interferência da idade, gravidade dos pacientes e presença de DRC, como observado em outros biomarcadores já avaliados. Além disso, como a atividade da enzima foi avaliada nos eritrócitos, não sofreu interferência do débito urinário e da reposição de volume.

Apesar de todos esses novos marcadores, a predição da LRA em pacientes com choque séptico permanece sendo um grande desafio. Além de todas as dificuldades citadas, a falta de entendimento abrangente a respeito da fisiopatologia da sepse induzindo a LRA para o estabelecimento de novos biomarcadores torna-se relevante.<sup>22</sup> O estresse oxidativo desempenha papel importante na fisiopatologia da sepse<sup>46</sup> e pode ser uma via comum entre o choque séptico e a LRA.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre o aumento na produção de EROs e ERNs e a diminuição das defesas antioxidantes, contribuindo para o dano oxidativo celular. Adicionalmente, existe complexo

sistema de defesa antioxidante e a SOD é considerada peça fundamental neste processo.

Estudos experimentais mostraram que a concentração e atividade da SOD1 estão reduzidas na DRC.<sup>35,37-39</sup> Vaziri et al. mostraram que a concentração de SOD1 foi reduzida e a expressão da enzima NADPH foi aumentada nos rins de ratos submetidos a nefrectomia.<sup>35</sup> Adicionalmente, em estudos com moléculas recombinantes da SOD1 e com transferência de genes da SOD1, os animais submetidos a essas intervenções apresentaram redução da inflamação e do estresse oxidativo em modelos experimentais de isquemia-reperfusão e LRA induzida por contraste.<sup>37-39</sup>

A atividade da SOD1 parece ser modulada por alguns fatores, como a concentração do zinco e cobre, produção de citocinas inflamatórias, idade, hiperglicemia, maior concentração de EROs, uremia e necessidade de diálise.

Em pacientes críticos, baixas concentrações de zinco plasmático estão associadas com maior gravidade da doença e maior intensidade da resposta inflamatória sistêmica.<sup>56,57</sup> Durante a sepse, em resposta ao exacerbado quadro infeccioso e inflamatório, ocorre aumento das citocinas inflamatórias. A IL-6 parece induzir a produção de metalotioneína, um quelante intracelular dos minerais, promovendo a compartimentalização celular do zinco e diminuindo a sua disponibilidade.<sup>58</sup>

Na circulação sanguínea, 95% do cobre é transportado pela ceruloplasmina, proteína de fase aguda, e como resultado as concentrações plasmáticas de cobre estão frequentemente elevadas em pacientes críticos<sup>33</sup>, excetuando-se os casos de uso de nutrição parenteral prolongada, grave perda gastrointestinal e pacientes queimados.<sup>32,33</sup>

Adicionalmente, sabe-se que a deficiência de ferro contribui para maior concentração de zinco nos eritrócitos e menor no plasma.<sup>59</sup> Pacientes críticos frequentemente apresentam importante perdas sanguíneas proporcionadas pelo trauma ou doença de base, procedimentos de diálise, coletas diárias de sangue para exames bioquímicos, passagem de acessos e cirurgias. Somado a isto, a própria infecção e algumas patologias como a doença renal contribuem para o quadro anêmico. No nosso trabalho, a possibilidade de

deficiência de ferro nos pacientes foi elevada, já que 85% tinham DRC estágio 1 a 3 e 73% eram de especialidades cirúrgicas.

Importante também considerarmos que a coleta do material biológico foi realizada precocemente. Todos os pacientes, pela instabilidade hemodinâmica, estavam em jejum ou recebendo oferta mínima de nutrição enteral ou parenteral. Por isso, a influência da variabilidade da ingestão alimentar entre os indivíduos sobre os estoques corporais dos minerais pode ser descartada.

Nesse trabalho, não incluímos a dosagem da concentração de zinco e cobre, pois o nosso objetivo foi avaliar a atividade da SOD1 como marcador de LRA e não investigar quais mecanismos poderiam levar a alteração na atividade da enzima.

Em estudo realizado em pacientes com DRC em hemodiálise, os autores avaliaram o estado nutricional relativo ao zinco e a atividade da SOD1.<sup>34</sup> A atividade da enzima foi menor em relação ao grupo controle, porém esse achado foi atribuído ao estresse oxidativo proporcionado pela própria doença e pelo tratamento dialítico e não pela concentração de zinco plasmático reduzida.<sup>34</sup>

Outra característica marcante do paciente crítico é o quadro de resistência à insulina e conseqüente hiperglicemia. Pelo processo de glicosilação da SOD1 pode haver diminuição da sua atividade. Em estudos prévios, a atividade eritrocitária da SOD1 foi inversamente correlacionada com o controle glicêmico em modelo experimental<sup>59</sup> e em pacientes diabéticos.<sup>60</sup> Em estudo recente, foi observada diminuição significativa da concentração sérica da SOD1 em pacientes com nefropatia diabética comparado ao grupo controle.<sup>61</sup>

Em relação à influência do tratamento dialítico na atividade da SOD1, os estudos são controversos. Alguns trabalhos mostraram aumento da atividade da enzima quando comparado pacientes dialisados e indivíduos saudáveis<sup>62</sup> e também após a sessão de hemodiálise (HD),<sup>63-65</sup> porém sem diferença entre a modalidade da diálise [HD ou diálise peritoneal (DP)].<sup>62</sup>

Ceballos-Picot et al. não encontraram diferença na atividade da SOD1 entre pacientes dialisados e indivíduos saudáveis.<sup>66</sup> Já outros autores, mostraram menor atividade da enzima tanto na HD quanto na DP quando comparado com o grupo controle<sup>34,63</sup> e também menor atividade em pacientes em DP quando comparado com pacientes em HD.<sup>63</sup>

Essa divergência nos achados pode ser atribuída à diferença de idade dos pacientes, uma vez que com o envelhecimento há redução na capacidade antioxidante do organismo, a variação no tempo de terapia dialítica e redução na atividade da enzima proporcionado pelo excesso de peróxido de hidrogênio e produtos da peroxidação lipídica formados durante a hemodiálise.<sup>34</sup>

Apenas 18% (n:12) dos nossos pacientes necessitaram de terapia de substituição renal e pelo número pequeno não foi possível avaliar a atividade da SOD1 de acordo com a modalidade de diálise.

No nosso estudo, a atividade eritrocitária da SOD1 foi menor nos pacientes que desenvolveram LRA. Esta associação continuou estatisticamente significativa mesmo quando ajustada para variáveis confundidoras na análise de regressão multivariada que foram idade, gênero, presença de DRC, concentração de hemoglobina, fósforo, APACHE II e categoria da admissão.

Os nossos achados mostram menor atividade da SOD1 eritrocitária nas primeiras 24 horas da admissão na UTI, assim, esta poderia ser usada como um marcador precoce de LRA, tanto pelo poder preditor quanto por se tratar de um método fácil, com custo intermediário e facilmente aplicável na prática clínica.

É importante lembrar que os pacientes com DRC possuem risco aumentado de desenvolver LRA. Isso poderia explicar por que os nossos pacientes que desenvolveram LRA apresentaram maiores valores de creatinina na admissão da UTI. Apesar disso, não houve correlação entre a creatinina e a atividade de eritrócitos SOD1. Assim, os nossos resultados não foram influenciados pela diferença inicial da função renal.

Considerando-se que o desenvolvimento de LRA em pacientes com sepse está relacionado com o aumento da mortalidade, a identificação de biomarcadores precoces de lesão renal é extremamente importante. A atividade eritrocitária da SOD1 foi associada com a detecção de LRA anteriormente aos critérios do KDIGO. Nossos resultados têm implicações clínicas importantes porque fomos capazes de identificar pacientes em risco de desenvolver LRA precocemente. Assim, os pacientes em risco poderiam ser tratados de forma mais agressiva, melhorando os resultados no choque séptico.

É também fundamental notar que além da atividade eritrocitária da SOD1 ter sido menor, a concentração sérica do MDA foi maior nos pacientes com choque séptico comparado aos indivíduos controle. Assim, nossos resultados sugerem que pacientes com choque séptico tem resposta prejudicada da SOD1 e aumento do estresse oxidativo, e esse comportamento foi mais pronunciado nos pacientes que desenvolveram LRA.

O MDA é uma marcador de peroxidação lipídica e está aumentado em pacientes com sepse grave e naqueles que evoluem ao óbito.<sup>27</sup> A sua elevada concentração é observada independentemente do local de infecção, tipo de microorganismo ou disfunção orgânica, sugerindo que a peroxidação lipídica seja atribuída à resposta geral do hospedeiro ao estresse ao invés de reação órgão ou patógeno-específico. A maior concentração sérica de MDA reforça a hipótese de que o estresse oxidativo, particularmente a peroxidação lipídica, contribuem para a fisiopatologia da sepse.<sup>67</sup>

Devemos considerar algumas limitações deste estudo. Foram incluídos pacientes de um único serviço de Terapia Intensiva. Em relação à definição da LRA, só temos a creatinina sérica basal de 55% dos pacientes que desenvolveram LRA; para os outros, utilizamos o valor mínimo atingido durante a hospitalização na ausência de diálise. Além disso, o diagnóstico da LRA foi feito com base nos valores de creatinina sérica e não no débito urinário. E devido ao número relativamente pequeno de pacientes, a análise da atividade da SOD1 não foi realizada de acordo com os estágios da LRA. O tipo e o tempo para administração da primeira dose de antibiótico também não foram registrados. Finalmente, a coleta do sangue foi feita nas primeiras 24 horas da admissão na UTI, o que é uma janela relativamente grande. Apesar dessas limitações, acreditamos fortemente que os nossos dados contribuem com conhecimentos relevantes sobre o papel da SOD1 como preditora precoce de LRA em pacientes com choque séptico.

**CONCLUSÃO**

Em conclusão, a atividade eritrocitária da SOD1 é um biomarcador precoce do desenvolvimento de lesão renal aguda em pacientes com choque séptico.

## **REFERÊNCIAS**

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801-10.
2. Instituto Latino-Americano para Estudos da Sepse. *Sepse: um problema de saúde pública*. Brasília: CFM; 2015. 90 p.
3. Florian BM, Sachin Y, Derek CA. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2014;5:4-11.
4. Silva E, Pedro MD, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewisk M, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care*. 2004;8(4):R251-60.
5. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Intensive Care Med*. 2013;41(2):580-637.
6. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013;369(9):840-51. doi: 10.1056/NEJMra1208623. Review. Errata em: *N Engl J Med*. 2013 Nov 21;369(21):2069.
7. Sharawy N. Vasoplegia in septic shock: do we really fight the right enemy? *J Crit Care*. 2014;29(1):83-7.
8. Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med*. 2001;345(8):588-95.
9. De Backer D, Orbegozo Cortes D, Donadello K, Vincent JL. Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. *Virulence*. 2014;5(1):73-9.
10. Jeger V, Djafarzadeh S, Jakob SM, Takala J. Mitochondrial function in sepsis. *Eur J Clin Invest*. 2013;43(5):532-42.
11. Harrois A, Huet O, Duranteau J. Alterations of mitochondrial function in sepsis and critical illness. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2009;22(2):143-9.

12. Beliz Bilgili, Murat Haliloğlu, İsmail Cinel. Sepsis and acute kidney injury. *Turk J Anaesth Reanim.* 2014;42:294-301.
13. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA.* 2005;294(7):813-8.
14. Coca SG, Yusuf B, Shlipak MG, Garg AX, Parikh CR. Long-term risk of mortality and other adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and metanalysis. *Am J Kidney Dis.* 2009;53(6):961-73.
15. Suh SH, Kim CS, Choi JS, Bae EH, Ma SK, Kim SW. Acute kidney injury in patients with sepsis and septic shock: risk factors and clinical outcomes. *Yonsei Med J.* 2013;54(4):965-72.
16. KDIGO AKI Work Group: KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. *Kidney Int Suppl.* 2012;2(1):1-138.
17. Wasung ME, Chawla LS, Madero M. Biomarkers of renal function, which and when? *Clin Chim Acta.* 2015;438:350-7. doi: 10.1016/j.cca.2014.08.039. Epub 2014 Sep 3.
18. Vijayan A, Faubel S, Askenazi DJ, Cerda J, Fissell WH, Heung M, et al. Clinical Use of the Urine Biomarker [TIMP-2] × [IGFBP7] for Acute Kidney Injury Risk Assessment. *Am J Kidney Dis.* 2016;68(1):19-28.
19. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P, et al. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(2):407-13.
20. McIlroy DR, Wagener G, Lee HT. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute kidney injury after cardiac surgery: the effect of baseline renal function on diagnostic performance. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(2):211-9.
21. Lameire N, Vanholder R, Van Biesen W. How to use biomarkers efficiently in acute kidney injury. *Kidney Int.* 2011;79(10):1047-50.

22. Gomez H, Ince C, De Backer D, Pickkers P, Payen D, Hotchkiss J, et al. A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics and the tubular cell adaptation to injury. *Shock*. 2014;41:3-11.
23. Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth*. 2011;107(1):57-64.
24. Mishra V. Oxidative stress and role of antioxidant supplementation in critical illness. *Clin Lab*. 2007; 53(3-4):199-209.
25. Goodyear-Bruch C, Pierce JD. Oxidative stress in critically ill patients. *Am J Crit Care*. 2002;11(6):543-51.
26. Rodrigo R, Libuy M, Feliú F, Hasson D. Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage. *Dis Markers*. 2013;35:773-90.
27. Lorente L, Martín MM, Abreu-González P, Domínguez-Rodríguez A, Labarta L, Díaz C, et al. Sustained high serum malondialdehyde levels are associated with severity and mortality in septic patients. *Crit Care*. 2013;17(6):R290. doi: 10.1186/cc13155.
28. Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J*. 2016; 15(1):71.
29. Koekkoek WA, van Zanten AR. Antioxidant vitamins and trace elements in critical illness. *Nutr Clin Pract*. 2016;31(4):457-74.
30. Cander B, Dundar ZD, Gul M, Girisgin S. Prognostic value of serum zinc levels in critically ill patients. *J Crit Care*. 2011;26(1):42-6.
31. Besecker BY, Exline MC, Hollyfield J, Phillips G, Di Silvestro RA, Wewers MD, et al. A comparison of zinc metabolism, inflammation, and disease severity in critically ill infected and noninfected adults early after intensive care unit admission. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(6):1356-64.

32. Stern BR. Essentiality and toxicity in copper health risk assessment: Overview, update and regulatory considerations. *J Toxicol Environ Health A*. 2010;73(2):114-27.
33. Rech M, To L, Tovbin A, Smoot T, Mlynarek M. Heavy metal in the intensive care unit: a review of current literature on trace element supplementation in critically ill patients. *Nutr Clin Pract*. 2014;29(1):78-89.
34. Noleto MRC, Guedes BAC, Batista SLV, Machado MNJ, Nascimento NN, Nascimento MD. Nutritional status of zinc and activity superoxide dismutase in chronic renal patients undergoing hemodialysis. *Nutr Hosp*. 2011;26(6):1456-61.
35. Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int*. 2003; 63(1):179-85.
36. Scholze A, Krueger K, Diedrich M, R ath C, Torges A, Jankowski V, et al. Superoxide dismutase type 1 in monocytes of chronic kidney disease patients. *Amino Acids*. 2011;41(2):427-38.
37. Yin M, Wheeler MD, Connor HD, Zhong Z, Bunzendahl H, Dikalova A, et al. Cu/Zn-superoxide dismutase gene attenuates ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(12): 2691-700.
38. Mortensen J, Shames B, Johnson CP, Nilakantan V. MnTMPyP, a superoxide dismutase/catalase mimetic, decreases inflammatory indices in ischemic acute kidney injury. *Inflamm Res*. 2011;60(3):299-307.
39. Pisani A, Sabbatini M, Riccio E, Rossano R, Andreucci M, Capasso C, et al. Effect of a recombinant manganese superoxide dismutase on prevention of contrast-induced acute kidney injury. *Clin Exp Nephrol*. 2014;18(3):424-31.
40. Fonseca I, Reguengo H, Almeida M, Dias L, Martins LS, Pedrosa S, et al. Oxidative stress in kidney transplantation: malondialdehyde is an early predictive marker of graft dysfunction. *Transplantation*. 2014;97(10):1058-65.

41. Fisher LD, Belle GV. Biostatistics: a methodology for health science. New York: John Wiley; 1993.
42. Whitehouse RC, Prasad AS, Rabbani PI, Cossack ZT. Zinc in plasma, neutrophils, lymphocytes and erythrocytes as determined by flameless atomic absorption spectrophotometry. Clin Chem. 1982;28(3):475-80.
43. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. Quim Nova. 2007;30(5):1323-38.
44. Pandey KB, Rizvi SI. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2011; 155(2):131-6.
45. Kikugawa K, Kojima T, Yamaki S, Kosugi H. Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylenediaminetetraacetic acid. Anal Biochem. 1992;202(2):249-55.
46. Costa NA, Gut AL, Pimentel JAC, Cozzolino SM, Azevedo PS, Fernandes AA, et al. Erythrocyte selenium concentration predicts intensive care unit and hospital mortality in patients with septic shock: a prospective observational study. Crit Care. 2014;18(3):R92.
47. Chawla LS, Eggers PW, Star RA, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. N Engl J Med. 2014;371(1):58-66.
48. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. Lancet. 2012;380(9843):756-66.
49. Vaara ST, Korhonen A-M, Kaukonen K-M, Nisula S, Inkinen O, Hoppu S, et al. Fluid overload is associated with an increased risk for 90-day mortality in critically ill patients with renal replacement therapy: data from the prospective FINNAKI study. Crit Care. 2012;16(5):R197.

50. Li X, Hassoun HT, Santora R, Rabb H. Organ crosstalk: the role of the kidney. *Curr Opin Crit Care*. 2009;15:481-7.
51. Hoste EA, Bagshaw SM, Bellomo R, Cely CM, Colman R, Cruz DN, et al. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med*. 2015;41(8):1411-23.
52. Udy AA, Roberts JA, Lipman J. Clinical implications of antibiotic pharmacokinetic principles in the critically ill. *Intensive Care Med*. 2013;39(12):2070-82.
53. Si Nga H, Medeiros P, Menezes P, Bridi R, Balbi A, Ponce D. Sepsis and AKI in clinical emergency room patients: the role of urinary NGAL. *BioMed Res Int*. 2015:ID 413751. doi:10.1155/2015/413751.
54. Schiffl H, Lang SM. Update on biomarkers of acute kidney injury: moving closer to clinical impact? *Mol Diagn Ther*. 2012;16(4):199-207.
55. Dellepiane S, Marengo M, Cantaluppi V. Detrimental cross-talk between sepsis and acute kidney injury: new pathogenic mechanisms, early biomarkers and targeted therapies. *Crit Care*. 2016;20:61.
56. Cander B, Dundar ZD, Gul M, Girisgin S. Prognostic value of serum zinc levels in critically ill patients. *J Crit Care*. 2011;26(1):42-6.
57. Besecker BY, Exline MC, Hollyfield J, Phillips G, Di Silvestro RA, Wewers MD, et al. A comparison of zinc metabolism, inflammation, and disease severity in critically ill infected and noninfected adults early after intensive care unit admission. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(6):1356-64.
58. Liuzzi JP, Lichten LA, Rivera S, Blanchard RK, Aydemir TB, Knutson MD, et al. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip 14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute phase response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(19):6843-8.
59. Kim JW, Nam SM, Kim YN, Yoo DY, Choi JH, Jung HY, et al. Treadmill exercise ameliorates diabetes-induced increases in lipid peroxidation and decrease in

- Cu, Zn-superoxide dismutase levels in the hippocampus of Zucker diabetic fatty rats. *J Vet Sci.* 2015;16(1):11-6.
60. Kumawat M, Sharma TK, Singh I, Singh N, Ghalaut VS, Vardey SK, et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus patients with and without nephropathy. *North Am J Med Sci.* 2013;5(3):213-9.
61. Al-Bayati MA, Jamil DA, Al-Aubaidy HA. Cardiovascular effects of copper deficiency on activity of superoxide dismutase in diabetic nephropathy. *North Am J Med Sci.* 2015;7(2):41-6.
62. Coaccioli S, Standoli ML, Biondi R, Panaccione A, Landucci P, Del Giorno R, et al. Assessment of the oxidative stress markers in patients with chronic renal insufficiency undergoing dialysis treatment. *Clin Ter.* 2010;161(5):441-4.
63. Stepniwska J, Dolegowska B, Popinska M, Salata D, Bufkowska M, Golembiewska E, et al. Prooxidative-Antioxidative balance of cells in different types of renal replacement therapy. *Blood Purif.* 2014;37(1):4-11.
64. Hernández RA, Mateo MC. Superoxide dismutase and catalase activities in patients undergoing hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ren Fail.* 1996;18(6):937-46.
65. Durak I, Akyol O, Başeşme E, Canbolat O, Kavutçu M. Reduced erythrocyte defense mechanisms against free radical toxicity in patients with chronic renal failure. *Nephron.* 1994; 66(1):76-80.
66. Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad BM, Nguyen AT, Thévenin M, Jaudon MC, et al. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med.* 1996;21(6):845-53.
67. Weiss SL, Deutschman CS. Elevated malondialdehyde levels in sepsis - something to 'stress' about? *Crit Care.* 2014;18(2):125. doi: 10.1186/cc13786.

# **ANEXO 1**

RESEARCH

Open Access



# Erythrocyte superoxide dismutase as a biomarker of septic acute kidney injury

Nara Aline Costa<sup>1</sup>, Ana Lúcia Gut<sup>1</sup>, Paula Schmidt Azevedo<sup>1</sup>, Suzana Erico Tanni<sup>1</sup>, Natália Baraldi Cunha<sup>1</sup>, Eloá Siqueira Magalhães<sup>1</sup>, Graziela Biude Silva<sup>2</sup>, Bertha Furlan Polegato<sup>1</sup>, Leonardo Antonio Mamede Zornoff<sup>1</sup>, Sergio Alberto Rupp de Paiva<sup>1</sup>, André Luís Balbi<sup>1</sup>, Daniela Ponce<sup>1</sup> and Marcos Ferreira Minicucci<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Oxidative stress is a key feature of sepsis and could be a common pathophysiological pathway between septic shock and acute kidney injury (AKI). Our objective was to evaluate the erythrocyte superoxide dismutase (SOD1) activity as predictor of AKI in patients with septic shock.

**Methods:** This is a prospective observational study that evaluated 175 consecutive patients over the age of 18 years with septic shock upon intensive care unit (ICU) admission. However, 43 patients were excluded (27 due to AKI at ICU admission). Thus, 132 patients were enrolled in the study. At the time of the patients' enrollment, demographic information was recorded. Blood samples were taken within the first 24 h of the patient's admission to determine the erythrocyte SOD1 activity. All patients were followed throughout the ICU stay, and the development of AKI was evaluated. In addition, we also evaluated 17 control subjects.

**Results:** The mean age of patients with septic shock was  $63.2 \pm 15.7$  years, 53 % were male and the median ICU stay was 8 days (4–16). Approximately 50.7 % developed AKI during the ICU stay. The median erythrocyte SOD1 activity was 2.92 (2.19–3.92) U/mg Hb. When compared to control subjects, septic shock patients had a higher serum malondialdehyde concentration and lower erythrocyte SOD1 activity. In univariate analysis, erythrocyte SOD1 activity was lower in patients who developed AKI. The ROC curve analysis revealed that lower erythrocyte SOD1 activity was associated with AKI development (AUC 0.686; CI 95 % 0.595–0.777;  $p < 0.001$ ) at the cutoff of  $<3.32$  U/mg Hb. In the logistic regression models, SOD1 activity higher than 3.32 U/mg Hb was associated with protection of AKI development when adjusted by hemoglobin, phosphorus and APACHE II score (OR 0.309; CI 95 % 0.137–0.695;  $p = 0.005$ ) and when adjusted by age, gender, chronic kidney disease, admission category (medical or surgery) and APACHE II score (OR 0.129; CI 95 % 0.033–0.508;  $p = 0.003$ ).

**Conclusions:** In conclusion, our data suggest that erythrocyte SOD1 activity could play a role as an early marker of septic AKI and could be seen as a new research avenue in the field of biomarker in AKI. However, our study did not show a strong correlation between SOD activity and AKI. Nevertheless, these original data do warrant further research in order to confirm or not this hypothesis.

**Keywords:** Superoxide dismutase, Acute kidney injury, Sepsis, Oxidative stress

## Background

Acute kidney injury (AKI) is one of the most serious and frequent complications of sepsis in critically ill patients

[1]. It is estimated that AKI develops within the first 24 h in 51–64 % of patients with sepsis with hypotension [2]. Septic shock is the major cause of death in the intensive care unit (ICU), and the presence of AKI in these patients leads to an increase in mortality [3].

The diagnosis of AKI is usually based on either an elevation of serum creatinine or the detection of oliguria [4]. However, these tests have limited sensitivity and

\*Correspondence: minicucci@fmb.unesp.br

<sup>1</sup> Department of Internal Medicine, Botucatu Medical School, UNESP – Univ Estadual Paulista, Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP CEP: 18618-970, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

specificity for the detection of renal dysfunction [5]. In this way, the development of biomarkers for the early detection of AKI is a research priority [6]. Some AKI markers are currently being intensely studied in several different clinical situations, mainly in critically ill patients [7–11]. However, some of these markers could be influenced by systemic inflammation and infections, and early AKI predictors in patients with sepsis are still lacking.

A barrier to uncovering new specific biomarkers for sepsis-induced AKI is a lack of understanding of its pathophysiology. It is known that the oxidative stress caused by sepsis is one factor responsible for its development [12, 13]. Oxidative stress is regulated by a balance between the rates of reactive oxygen species (ROS) generation and antioxidant systems, including superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase, thioredoxin and vitamins [14]. SOD is considered to be the first line of defense against ROS because it catalyzes the dismutation of superoxide radicals to a less reactive product, hydrogen peroxide. Increased ROS production or an impaired antioxidant system will lead to oxidative damage to proteins, lipids and DNA. There is no ideal marker for oxidative stress; however, with regard to lipid peroxidation, malondialdehyde (MDA) is one of the most commonly used markers for the determination of oxidative stress in humans [15].

Experimental and clinical studies of chronic kidney disease showed that SOD levels were reduced and markers of oxidative damage were increased in this scenario [16–18]. In addition, strategies to increase SOD activity with recombinant SOD molecules and gene transfer led to reduced inflammation and oxidative stress in experimental models of ischemia–reperfusion and contrast-induced AKI [19–21]. It is also interesting to observe that in patients submitted to kidney transplantation, MDA levels were predictors of graft dysfunction [22, 23]. Despite the importance of oxidative stress, SOD1 activity has not yet been evaluated as predictor of AKI in patients with septic shock.

Therefore, the aim of our study was to evaluate the erythrocyte SOD1 activity as predictor of AKI in patients with septic shock.

## Methods

This prospective observational study was conducted from May 2014 to June 2015 with patients admitted to the intensive care unit of our hospital. The protocol was approved by the ethics committee of our institution (30457414.7.0000.5411). Written informed consent was obtained from all patients or relatives prior to their inclusion in the study.

This study was a subanalysis of a larger unpublished study, which evaluated the relationship between oxidative

stress and mortality in patients with septic shock. The sample size was calculated using the Fisher and Belle formula, with the following variables: mortality rate of septic shock 40–60 %, 95 % confidence interval and 10 % sample error. The result was a minimum sample size of 96 patients.

Patients were eligible for enrollment if they were 18 years or older and had septic shock on ICU admission. Exclusion criteria were patients with AKI at ICU admission, patients with stage 4 or 5 chronic kidney disease (CKD) (creatinine clearance lower than 30 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>), a delay in septic shock diagnosis (longer than 24 h), pregnant women, patients with confirmed brain death, patients in palliative care, and those who used vasoactive drugs for <24 h.

At the time of the patients' enrollment, demographic information, the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE II) score and the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score were recorded. Blood samples were taken within the first 24 h of the patient's admission, after hemodynamic stabilization, to determine the erythrocyte SOD1 activity. All patients were followed during their ICU stay, and the development of AKI was evaluated. Mortality rate and the length of the ICU stay were also recorded.

Septic shock was defined according to Survival Sepsis guidelines [24], and AKI was defined according to Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) criteria, using the increase in serum creatinine  $\geq 0.3$  mg/dL within 48 h or increase in serum creatinine  $\geq 1.5$  times baseline within 7 days [25]. Classification of AKI remains challenging because serum creatinine measurements, before the inciting illness, are often missing. In the absence of a standard method to accommodate missing values, investigators have used a variety of surrogate measures. One of these methods is to use the baseline creatinine as the lowest creatinine value in the last 6 months before AKI or, for those without this measurement, the lowest value achieved during hospitalization in the absence of dialysis [26, 27]. This was the definition we used of baseline creatinine in our study. CKD was defined as glomerular filtration rate lower than 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> using baseline creatinine and CKD Epidemiology Collaboration equation (CKD-EPI) ( $GFR = 141 \times \min(Scr/\kappa, 1)^\alpha \times \max(Scr/\kappa, 1) - 1.209 \times 0.993 \text{ Age} \times 1.018$  [if female]  $_ - 1.159$  [if black], where Scr is serum creatinine,  $\kappa$  is 0.7 for females and 0.9 for males,  $\alpha$  is  $-0.329$  for females and  $-0.411$  for males, min indicates the minimum of  $Scr/\kappa$  or 1, and max indicates the maximum of  $Scr/\kappa$  or 1) [28].

To understand the behavior of erythrocyte SOD1 activity in our patients with septic shock, we also evaluated these variables in 17 control subjects (non-hospitalized individuals without any acute disease).

### Laboratorial analysis

Total serum levels of sodium, potassium, phosphorus, C-reactive protein (CRP), albumin, creatinine and urea were measured using the dry chemistry method (Ortho-Clinical Diagnostics VITROS 950<sup>®</sup>, Johnson & Johnson), and lactate was measured using a Roche OMNI<sup>®</sup> S Blood Gas Analyzer. Hemograms were performed with a Coulter STKS hematologic autoanalyzer (Luton/Bedfordshire, UK).

### Serum MDA concentration

Serum MDA levels were analyzed based on the reaction with thiobarbituric acid by high-performance liquid chromatography (HPLC) according to a method developed by Katepe [29]. UV detection was performed at 532 nm.

### Erythrocyte SOD1 activity

The SOD enzyme activity in erythrocytes was determined in a Lysis biochemical analyzer according to methodology recommended by the manufacturer (Ransod kit; Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Antrim, UK) [30].

### Statistical analysis

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD, the median (including the lower and upper quartiles) or percentage. Comparisons between two groups for continuous variables were made using Student's *t* test or the Mann–Whitney *U* test. Comparisons between two groups for categorical variables were made using the  $\chi^2$  test or Fisher's exact test. Comparisons between continuous variables were made using Spearman correlation test. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed to determine the performance of erythrocyte SOD1 activity to predict AKI development. A logistic regression model was used to predict AKI. We constructed two regression models. Erythrocyte SOD1 activity was tested as a categorical variable ( $>3.32$  U/mg Hb, cutoff obtained by ROC curve). In the first model, erythrocyte SOD1 activity was adjusted with parameters that exhibited significant differences in the univariate analysis. The only exceptions were variables with high collinearity among them (urea, creatinine, potassium, MDA, CKD and SOFA score). In the other, SOD1 was adjusted by age, gender, CKD, admission category (medical or surgery) and APACHE II score. Data analysis was performed using SigmaPlot software for Windows v12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). *p* values lower than 0.05 were considered statistically significant.

### Results

During the study, 175 consecutive patients were admitted with a diagnosis of septic shock in the ICU; however, 43 patients were excluded (presence of AKI at ICU

admission: 27 patients; delay in septic shock diagnosis: 12 patients; presence of advanced chronic kidney disease: 4 patients). Thus, we evaluated 132 patients (Fig. 1). The mean age was  $63.2 \pm 15.7$  years, 53 % were male and the median length of ICU stay was 8 days (4–16). The mortality rate during the ICU stay was 65.9 %. Median erythrocyte SOD1 activity was 2.92 (2.19–3.92) U/mg Hb.

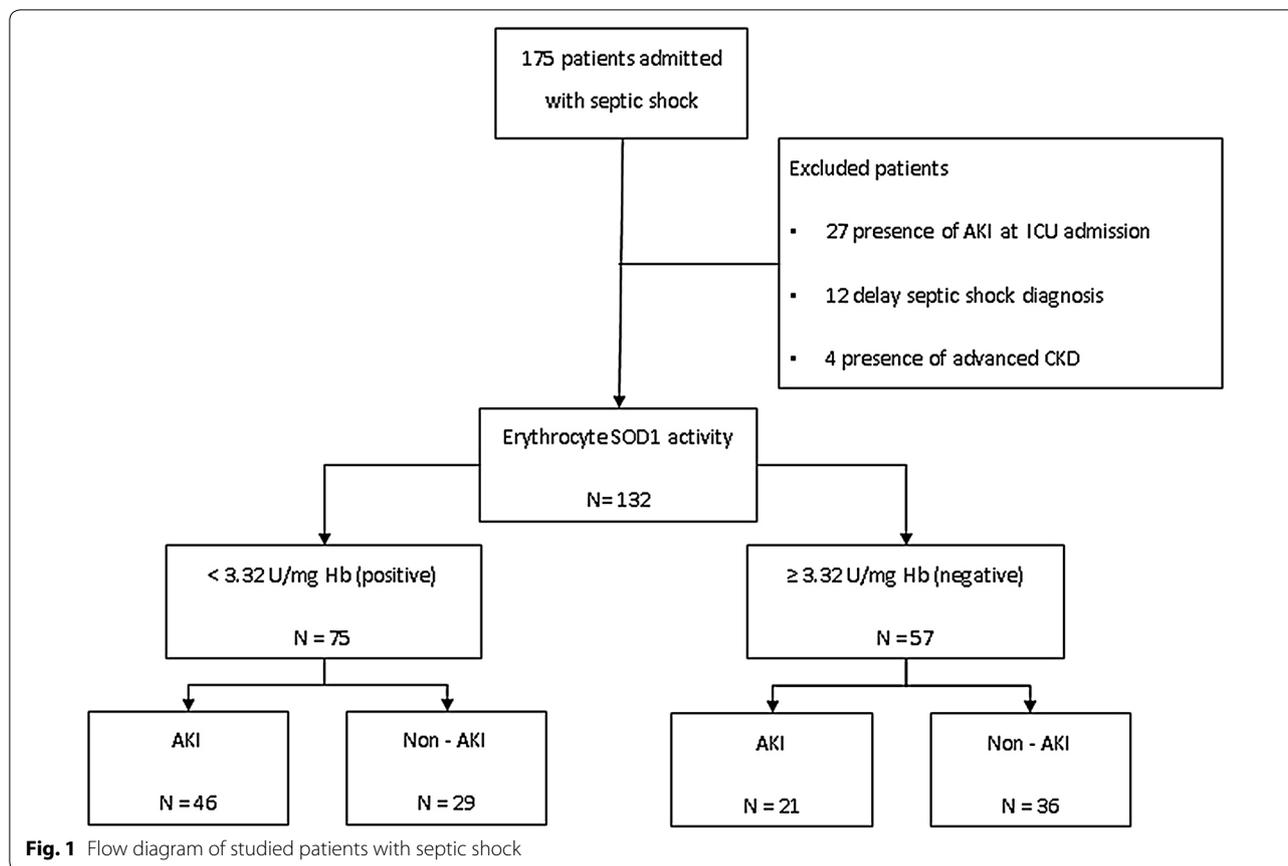
Among those patients with septic shock, 50.7 % developed AKI during the ICU stay. We have baseline serum creatinine levels in 37 patients of 67 patients who developed AKI, and in 30 patients, we used the lowest value achieved during hospitalization in the absence of dialysis. Regarding KDIGO stages, 17.9 % were classified as KDIGO 1, 19.4 % as KDIGO 2 and 62.7 % as KDIGO 3. The median time for AKI diagnosis based on KDIGO criteria was 2.3 days after admission. Among patients who developed AKI, 24.5 % needed dialysis during the ICU stay. The APACHE II and SOFA scores were also higher in patients in the AKI group. The mortality rate increased more than 30 % in patients with AKI. There were no differences between groups in the other demographic and clinical data (Table 1).

The laboratory data are presented in Table 2. Patients who developed AKI had higher levels of potassium, phosphorus, MDA, urea and creatinine and lower levels of hemoglobin at baseline than patients without renal injury.

Erythrocyte SOD1 activity was lower in patients who developed AKI [non-AKI: 3.62 (2.59–4.34) vs AKI: 2.62 (2.02–3.63) U/mg Hb; *p* = 0.001; Fig. 2]. It is also important to observe that, although creatinine levels at ICU admission were higher in patients who developed AKI during ICU stay, erythrocyte SOD1 activity was not correlated with serum creatinine at ICU admission (Fig. 3). Our patients with septic shock had higher levels of serum MDA concentration [septic shock (*n*:132): 1.43 (0.77–2.19)  $\mu$ mol/L; controls (*n*:17): 0.86 (0.49–1.07)  $\mu$ mol/L; *p* = 0.003] and lower erythrocyte SOD1 activity [septic shock (*n*:132): 2.92 (2.19–3.92) U/mg Hb; controls (*n*:17): 4.35 (3.32–4.68) U/mg Hb; *p* = 0.001] when compared to control subjects.

The ROC curve analysis revealed that lower erythrocyte SOD1 activity was associated with AKI development (AUC 0.686; CI 95 % 0.595–0.777; *p* < 0.001) at the cutoff of  $<3.32$  U/mg Hb [sensitivity: 68.7 % (CI 95 % 57.6–79.8 %); specificity: 55.4 % (CI 95 % 43.3–67.5 %); positive predictive value: 61.3 % (CI 95 % 50.3–72.3 %); negative predictive value: 63.2 % (CI 95 % 50.7–75.7 %)] (Table 3; Fig. 4).

In the logistic regression models, SOD1 activity higher than 3.32 U/mg Hb was associated with protection of AKI development when adjusted by hemoglobin, phosphorus and APACHE II score (OR 0.309; CI 95 %



0.137–0.695;  $p = 0.005$ ) and when adjusted by age, gender, CKD, admission category (medical or surgery) and APACHE II (OR 0.129; CI 95 % 0.033–0.508;  $p = 0.003$ ; Table 4).

**Discussion**

The objective of our study was to evaluate the erythrocyte SOD1 activity as marker of AKI in patients with septic shock. Although our study is a preliminary data, it showed for the first time in septic shock patients that erythrocyte SOD1 activity plays a role as a biomarker of AKI.

Sepsis is defined as the presence (probable or documented) of infection together with a systemic inflammatory response [24]. Septic shock is defined as sepsis-induced hypotension that persists despite adequate fluid resuscitation [24]. Regardless of the creation of international guidelines for the early diagnosis and treatment of septic shock, its mortality remains high. This mortality rate is even higher when septic shock is associated with AKI. In our study, the mortality rate increased more than 30 % in patients with AKI. Thus, the early detection and treatment of patients who develop AKI are extremely important.

Several studies were performed in different clinical settings to identify biomarkers for AKI prediction, most of them in critically ill patients [5–8, 10, 11]. Until now, there have been four major categories of biomarkers for AKI in these patients: functional markers, such as serum creatinine; up-regulated proteins, such as NGAL and IL-18; low molecular weight proteins, such as urine cystatin C; and enzymes, such as alpha-glutathione *s*-transferase and pi-glutathione *s*-transferase [10]. Recently, the combination of urine tissue inhibitor of metalloproteinase 2 and insulin-like growth factor binding protein 7, known as TIMP-2 × IGFBP7, was allowed for marketing by the US Food and Drug Administration [11]. Up-regulation of these markers in patients with AKI has been proposed to reflect their growth-inhibitory function due to G1 cell-cycle arrest, a known consequence of AKI [11]. Despite all of these new markers, the prediction of AKI in patients with septic shock is still challenging. A barrier to uncovering new biomarkers for this scenario is a lack of understanding of the pathophysiology of sepsis-induced AKI [12, 13]. However, oxidative stress is a key feature of sepsis and could be a common pathophysiological pathway between septic shock and AKI [31].

**Table 1 Demographic and clinical data of 132 patients with septic shock**

Variable	Acute kidney injury		p value
	Yes (n = 67)	No (n = 65)	
Age (years)	67.0 (59.0–75.0)	64.0 (50.5–72.5)	0.20
Male, n (%)	35.0 (52.2)	35 (53.8)	0.99
APACHE II score	18.7 ± 6.0	16.0 ± 6.4	<0.001
SOFA score	10.0 (8.0–12.0)	8.0 (7.0–9.5)	<0.001
RBC transfusions, n (%)	36 (53.7)	29 (44.6)	0.38
Steroids, n (%)	38 (56.7)	30 (46.2)	0.30
Admission category, n (%)			
Medical	18 (26.9)	27 (41.5)	0.11
Surgery	49 (73.1)	38 (58.5)	
Sepsis focus, n (%)			0.46
Respiratory	42 (62.7)	34 (52.3)	
Abdominal	16 (23.8)	16 (24.6)	
Urinary	3 (4.5)	4 (6.2)	
Others	6 (9.0)	11 (16.9)	
Dialysis, n (%)	11 (16.4)	0 (0)	0.002
CKD, n (%)	57 (85.1)	7 (10.8)	<0.001
MV, n (%)	60 (89.6)	55 (84.6)	0.56
Length of ICU stay (days)	7.0 (5.0–15.0)	9.0 (4.0–16.5)	0.63
ICU mortality, n (%)	52.0 (77.6)	35.0 (53.8)	0.007

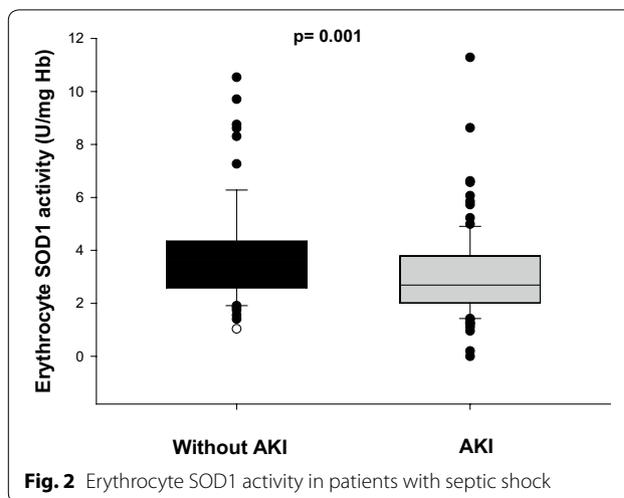
Data are expressed as the mean ± SD, median (including the lower and upper quartiles) or percentage

APACHE II Acute Physiology and Chronic Health Evaluation, SOFA Sequential Organ Failure Assessment, RBC red blood cells, CKD chronic kidney disease, MV mechanical ventilation, ICU intensive care unit

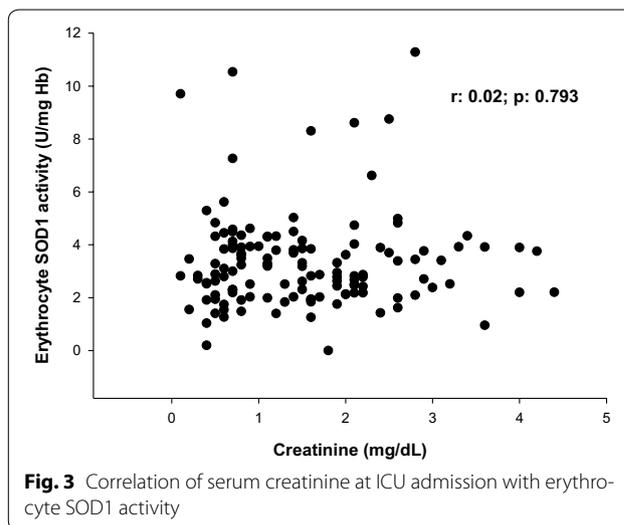
**Table 2 Laboratory data of 132 patients with septic shock**

Variable	Acute kidney injury		p value
	Yes (n = 67)	No (n = 65)	
Lactate (mmol/L)	2.2 (1.4–3.5)	2.1 (1.1–3.4)	0.78
Hemoglobin (g/dL)	11.0 (9.1–12.0)	11.6 (10.0–12.7)	0.025
Hematocrit (%)	32.0 ± 6.4	34.1 ± 5.7	0.06
Leukocytes (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	16.6 (12.2–21.6)	16.3 (12.2–24.0)	0.89
Sodium (mmol/L)	145 (140–149)	141 (137–148)	0.21
Potassium (mmol/L)	4.5 ± 0.9	4.1 ± 0.7	0.013
Phosphorus (mg/dL)	4.7 (3.4–6.6)	3.9 (2.7–4.9)	0.004
Glycemia (mg/dL)	145 (118–186)	146 (115–184)	0.87
CRP (mg/dL)	36.0 (28.0–44.1)	32.0 (8.5–41.5)	0.07
MDA (µmol/L)	1.65 (1.02–2.52)	1.25 (0.60–2.01)	0.009
Albumin (g/dL)	2.3 (2.0–2.5)	2.1 (1.8–2.8)	0.61
Urea (mg/dL)	95 (67–159)	53 (32–86)	<0.001
Creatinine (mg/dL)	2.1 (1.6–2.6)	0.7 (0.5–1.1)	<0.001

Data are expressed as median (including the lower and upper quartiles)  
CRP C-reactive protein



**Fig. 2** Erythrocyte SOD1 activity in patients with septic shock

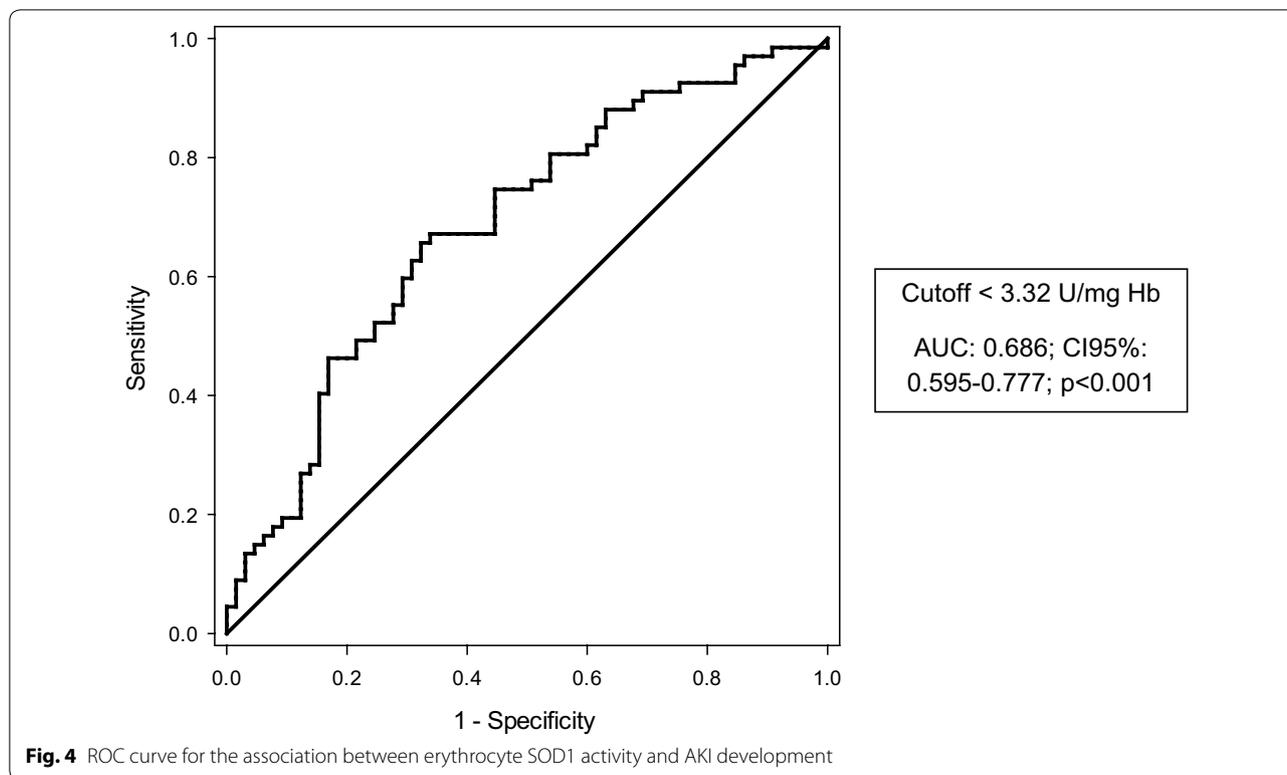


**Fig. 3** Correlation of serum creatinine at ICU admission with erythrocyte SOD1 activity

**Table 3 Cross-tabulation of erythrocyte SOD1 activity and acute kidney injury development**

Erythrocyte SOD1 activity	Acute kidney injury		
	Yes	No	Total
<3.32 U/mg Hb (positive)	46	29	75
≥3.32 U/mg Hb (negative)	21	36	57
Total	67	65	132

Oxidative stress is characterized as an imbalance between ROS and antioxidant pathways, leading to oxidative damage to proteins, lipids and DNA. At the



**Table 4** Logistic regression model for the prediction of acute kidney injury in 132 patients with septic shock

Variable	OR	IC 5–95 %	p value
SOD1 >3.32 U/mg Hb <sup>a</sup>	0.326	0.158–0.671	0.002
SOD1 >3.32 U/mg Hb <sup>b</sup>	0.129	0.033–0.508	0.003
SOD1 >3.32 U/mg Hb <sup>c</sup>	0.309	0.137–0.695	0.005

<sup>a</sup> Unadjusted

<sup>b</sup> Adjusted by gender, age, chronic kidney disease, admission category and APACHE II score

<sup>c</sup> Adjusted by APACHE II, phosphorus and hemoglobin

nanomolar scale, ROS play an important role in physiological processes by functioning as a second messenger in signal transduction pathways [32]. However, at the micromolar scale, ROS is associated with oxidative injury [32]. SOD is considered the first line of defense against ROS, consisting of three isoenzymes: copper/zinc SOD (SOD1), which is localized in the cytosol, nucleus and intermembrane space of mitochondria; manganese SOD (SOD2), which occurs in the mitochondrial matrix; and extracellular SOD (SOD3) [33]. SOD1 is the most abundant member of the family of antioxidant enzymes, representing approximately 90 % of SODs [34].

Experimental studies showed that SOD concentration and activity are reduced in chronic kidney injury [17,

19–21]. Vaziri et al. showed that SOD concentration was reduced and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase expression was increased in the kidneys of rats submitted to nephrectomy [17]. Additionally, in studies with recombinant SOD molecules and SOD gene transfer, the animals submitted to these interventions presented reduced inflammation and oxidative stress in experimental models of ischemia–reperfusion and contrast-induced AKI [19–21].

In a clinical study with 134 individuals, Magalhães et al. compared hemodialyzed patients with healthy controls and showed that the activity of SOD is reduced in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis [16]. In our study, the activity of erythrocyte SOD1 was also lower in patients who developed AKI. This association remains statistically significant, even after adjustments for confounding variables in multivariate regression analysis. It is also important to note that erythrocyte SOD1 activity was lower and serum MDA concentration was higher in septic shock patients compared to control subjects. Thus, our results suggest that patients with septic shock had an impaired SOD1 response and increased oxidative stress, and this behavior was more pronounced in patients who developed AKI. In addition, this lower SOD1 activity occurred in the first 24 h of ICU admission.

The AUC of erythrocyte SOD1 activity was only 0.686; however, comparisons of AUCs of several biomarkers for AKI prediction showed also a poor performance with a huge variation in its values [35, 36]. Thus, our data suggest that erythrocyte SOD1 activity could be used as an early predictive marker of AKI.

It is important to remember that patients with chronic kidney disease have an increased risk to develop AKI. This could explain why our patients who developed AKI had higher levels of creatinine at ICU admission. Despite that, there was no correlation between creatinine at ICU admission and erythrocyte SOD1 activity. Thus, our results were not influenced by the initial difference in kidney function.

Considering that the development of AKI in patients with sepsis is related to increased mortality, the identification of early biomarkers of renal injury is extremely important. Erythrocyte SOD1 activity was associated with AKI detection 2.3 days before the KDIGO criteria. Our results have important clinical implications because we were able to identify patients at risk of developing AKI earlier. Thus, patients at risk of AKI could be treated more aggressively, improving septic shock outcomes.

We should consider some limitations of this study. We only included patients from a single medical center. Regarding AKI definition, we only have baseline serum creatinine of 55 % of patients who developed AKI, for the others we used the lowest value achieved during hospitalization in the absence of dialysis. Moreover, AKI was defined based upon the serum creatinine levels and not urine output. In addition, due to the relatively small number of patients, analysis of SOD1 according to the stage of AKI was not performed. Timing of antibiotic dosing was also not recorded, and blood was taken within the first 24 h, which is a relatively large window. Finally, the AUC of erythrocyte SOD1 activity was only 0.686, and our study is a preliminary data with a limited internal and external validity. Despite these limitations, we strongly believe that our data contribute relevant knowledge regarding the roles of SOD as early predictor of AKI in patients with septic shock.

## Conclusions

In conclusion, our data suggest that erythrocyte SOD1 activity could play a role as an early marker of septic AKI and could be seen as a new research avenue in the field of biomarker in AKI. However, our study did not show a strong correlation between SOD activity and AKI. Nevertheless, these original data do warrant further research in order to confirm or not this hypothesis.

## Abbreviations

AKI: acute kidney injury; AKIN criteria: acute kidney injury network criteria; APACHE II score: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score; CI 95 %: confidence interval 95 %; CKD: chronic kidney disease; CRP: C-reactive protein; GFR: glomerular filtration rate; HPLC: high-performance liquid chromatography; ICU: intensive care unit; MDA: malondialdehyde; NGAL: neutrophil gelatinase-associated lipocalin; OR: odds ratio; ROS: reactive oxygen species; Scr: serum creatinine; SOFA score: Sequential Organ Failure Assessment score; SOD1: superoxide dismutase 1.

## Authors' contributions

PSA, NBC, ESM and BFB were involved in acquisition of subjects and data, analysis and interpretation of data, revising the article critically; SET, GBS and ALB were involved in laboratorial analysis, statistical analysis, interpretation of data, revising the article critically; NAC, SARP, MFM, LAMZ, ALG and DP were involved in study design, analysis and interpretation of data, and drafting the manuscript. All authors revised the article critically for important intellectual content and approved the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Author details

<sup>1</sup> Department of Internal Medicine, Botucatu Medical School, UNESP – Univ Estadual Paulista, Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP CEP: 18618-970, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Food and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Funding

This study was funded by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP—2014/17262-0) and by CAPES (“Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior”).

Received: 11 May 2016 Accepted: 29 September 2016

Published online: 06 October 2016

## References

1. Lafrance JP, Miller DR. Acute kidney injury associates with increased long-term mortality. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21:345–52.
2. Murugan R, Karajala-Subramanyam V, Lee M, Yende S, Kong L, Carter M, et al. Acute kidney injury in non-severe pneumonia is associated with an increased immune response and lower survival. *Kidney Int*. 2010;77:527–35.
3. Singbartl K, Kellum JA. AKI in the ICU: definition, epidemiology, risk stratification, and outcomes. *Kidney Int*. 2012;81:819–25.
4. Mehta RL, Chertow GM. Acute renal failure definitions and classification: time for change? *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:2178–87.
5. Bjornsson TD. Use of serum creatinine concentrations to determine renal function. *Clin Pharmacokinet*. 1979;4:200–22.
6. American society of nephrology. American society of nephrology renal research report. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:1886–903.
7. Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Husing J, Göring F, Pietruck F, Janssen O, et al. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int*. 2004;66:1115–22.
8. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet*. 2005;365:1231–8.
9. Nga HS, Medeiros P, Menezes P, Bridi R, Balbi A, Ponce D. Sepsis and AKI in clinical emergency room patients: the role of urinary NGAL. *Biomed Res Int*. 2015;2015:413751.
10. Geus HRRH, Betjes MG, Bakker J. Biomarkers for prediction of acute kidney injury: a narrative review on current status and future challenges. *Clin Kidney J*. 2012;5:102–8.

11. Vijayan A, Faubel S, Askenazi DJ, Cerda J, Fissell WH, Heung M, et al. Clinical use of the urine biomarker [TIMP-2] × [IGFBP7] for acute kidney injury risk assessment. *Am J Kidney Dis*. 2016. doi:10.1053/j.ajkd.2015.12.033.
12. Gomez H, Ince C, De Backer D, Pickkers P, Payen D, Hotchkiss J, et al. A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics and the tubular cell adaptation to injury. *Shock*. 2014;41:3–11.
13. Himmelfarb J, McMonagle E, Freedman S, Klenzak J, McMenamin E, Le P, et al. Oxidative stress is increased in critically ill patients with acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:2449–56.
14. Noda Y, Ota K, Shirasawa T, Shimizu T. Copper/zinc superoxide dismutase insufficiency impairs progesterone secretion and fertility in female mice. *Biol Reprod*. 2012;86:1–8.
15. Rodrigo R, Libuy M, Feliú F, Hasson D. Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage. *Dis Markers*. 2013;35:773–90.
16. Noleto Magalhães RC, Guedes Borges de Araujo C, Batista de Sousa Lima V, Machado Moita Neto J, do Nascimento Nogueira N, do Nascimento Marreiro D. Nutritional status of zinc and activity superoxide dismutase in chronic renal patients undergoing hemodialysis. *Nutr Hosp*. 2011;26:1456–61.
17. Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int*. 2003;63:179–85.
18. Scholze A, Krueger K, Diedrich M, Rãth C, Torges A, Jankowski V, et al. Superoxide dismutase type 1 in monocytes of chronic kidney disease patients. *Amino Acids*. 2011;41:427–38.
19. Yin M, Wheeler MD, Connor HD, Zhong Z, Bunzendahl H, Dikalova A, et al. Cu/Zn-superoxide dismutase gene attenuates ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:2691–700.
20. Mortensen J, Shames B, Johnson CP, Nilakantan V. MnTMPyP, a superoxide dismutase/catalase mimetic, decreases inflammatory indices in ischemic acute kidney injury. *Inflamm Res*. 2011;60:299–307.
21. Pisani A, Sabbatini M, Riccio E, Rossano R, Andreucci M, Capasso C, et al. Effect of a recombinant manganese superoxide dismutase on prevention of contrast-induced acute kidney injury. *Clin Exp Nephrol*. 2014;18:424–31.
22. Fonseca I, Reguengo H, Almeida M, Dias L, Martins LS, Pedrosa S, et al. Oxidative stress in kidney transplantation: malondialdehyde is an early predictive marker of graft dysfunction. *Transplantation*. 2014;97:1058–65.
23. Fonseca I, Reguengo H, Oliveira JC, Martins LS, Malheiro J, Almeida M, et al. A triple-biomarker approach for the detection of delayed graft function after kidney transplantation using serum creatinine, cystatin C, and malondialdehyde. *Clin Biochem*. 2015;48:1033–8.
24. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med*. 2013;41:580–637.
25. Clinical Practice Guidelines for Acute Kidney Injury; 2012. [http://www.kdigo.org/clinical\\_practice\\_guidelines/AKI.php](http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/AKI.php).
26. Gammelager H, Christiansen CF, Johansen MB, Tønnesen E, Jespersen B, Sørensen HT. Five-year risk of end-stage renal disease among intensive care patients surviving dialysis-requiring acute kidney injury: a nationwide cohort study. *Crit Care*. 2013;17:R145.
27. Siew ED, Matheny ME, Ikizler TA, Lewis JB, Miller RA, Waitman LR, et al. Commonly used surrogates for baseline renal function affect the classification and prognosis of acute kidney injury. *Kidney Int*. 2010;77:536–42.
28. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2009;150:604–12.
29. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem*. 1997;43:1209–14.
30. Ferro FE, de Sousa Lima VB, Soares NR, de Sousa Almondes KG, Pires LV, Cozzolino SM, et al. Parameters of metabolic syndrome and its relationship with zincemia and activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in obese women. *Biol Trace Elem Res*. 2011;143:787–93.
31. Costa NA, Gut AL, Pimentel JAC, Cozzolino SM, Azevedo PS, Fernandes AA, et al. Erythrocyte selenium concentration predicts intensive care unit and hospital mortality in patients with septic shock: a prospective observational study. *Crit Care*. 2014;18:R92.
32. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82:47–95.
33. Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem*. 2001;276:38388–93.
34. Noor R, Mittal S, Iqbal J. Superoxide dismutase—applications and relevance to human diseases. *Med Sci Monit*. 2002;8:RA210–5.
35. Lameire NH, Vanholder RC, Van Biesen WA. How to use biomarkers efficiently in acute kidney injury. *Kidney Int*. 2011;79:1047–50.
36. Metzger J, Kirsch T, Schiffer E, Ulger P, Menten E, Brand K, et al. Urinary excretion of twenty peptides forms an early and accurate diagnostic pattern of acute kidney injury. *Kidney Int*. 2010;78:1252–62.

Submit your manuscript to a SpringerOpen® journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Immediate publication on acceptance
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

---

Submit your next manuscript at ► [springeropen.com](http://springeropen.com)

---