

Nara Aline Costa

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE
SELÊNIO, O POLIMORFISMO PRO198LEU DA
GLUTATIONA PEROXIDASE 1 E A MORTALIDADE
EM PACIENTES COM CHOQUE SÉPTICO**

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

Orientador: Prof^o Dr. *Marcos Ferreira Minicucci*

Coorientadora: Prof^a Dra. *Ana Lúcia Que*

Botucatu
2014

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

Costa, Nara Aline.

Associação entre a concentração de selênio, o polimorfismo Pro198Leu da glutathiona peroxidase 1 e a mortalidade em pacientes com choque séptico / Nara Aline Costa. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Marcos Ferreira Minicucci

Coorientador: Ana Lúcia Gut

Capes: 40101002

1. Polimorfismo (Genética). 2. Choque séptico. 3. Selênio. 4. Stress oxidativo.

Palavras-chave: Choque séptico; Polimorfismo Pro198Leu; Selênio.

Dedicatória

Aos meus pais ANTONIO e MARIZA,
por me serem meu porto seguro.
Obrigada pelo amor e educação
oferecidos com tanto carinho.

À minha irmã NÍDIA e a
minha avó MARIA por serem
essenciais na minha vida.

Agradecimentos

A DEUS e a ESPIRITUALIDADE pela oportunidade de vida e por terem sempre me conduzido por caminhos muito melhores que os meus próprios sonhos.

Ao querido professor MARCOS MINICUCCI por ter me proporcionado a honra de ser sua orientada. MUITÍSSIMO obrigada pela generosidade na transmissão dos ensinamentos, pela paciência, amizade e por ser esse grande exemplo de humanidade e competência.

Às minhas amigas irmãs CARINA e NATÁLIA pela amizade devotada e companhia nos momentos difíceis e alegres.

Agradeço aos professores

Profa. ANA GUT, pela participação dedicada na co-orientação dessa dissertação. Obrigada pela contribuição fundamental durante o período da coleta dos pacientes, pelos ensinamentos e amizade.

Prof. SÉRGIO PAIVA pela imensa contribuição científica oferecida na elaboração desse trabalho. Obrigada também pelas críticas sempre construtivas e pelo exemplo de amor a pesquisa.

Profs. BERTHA FURLAN, LUIZ MATSUBARA, PAULA SCHIMIDT e LEONARDO ZORNOFF pelas conversas, risadas e conselhos. Sem dúvida alguma vocês são grandes exemplos para nós alunos.

Profa. ANGÉLICA pela contribuição nas dosagens da proteína carbonila.

Profa. SÍLVIA COZZOLLINO por generosamente nos conceder espaço para a realização de algumas dosagens desse trabalho.

Às amigas de pós - graduação

ANDRÉA GONÇALVES, BÁRBARA PERES, BRUNA RAFACHO e MARIANA DORNA pela amizade e incentivo em todos os momentos, muito obrigada meninas!

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Clínica Médica

BRUNO, ELISÂNGELA, LAURA, MÁRIO e RENATO que nos atendem sempre com muita gentileza e atenção. Meus sinceros agradecimentos.

Aos funcionários da Unidade em Pesquisa Experimental

ELENIZE, JOSÉ, MÁRIO e NILZETE que nos atendem com grande competência e disponibilidade.

Aos médicos intensivistas, residentes, enfermeiros, auxiliares e técnicos em enfermagem que contribuíram durante todo o período da coleta dos pacientes. Em especial, meu muito obrigada à FÁBIO YAMAGUTI, WAGNER IONEDA, PATRÍCIA POLLA, DANIELLE VITAL e LAÉRCIO DE STEFANO pela amizade e imensa contribuição para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos funcionários e pós-graduandos do Laboratório de Nutrição e Minerais/USP por me receberem de braços abertos e contribuírem durante todo o período de análises. Em especial, deixo registrada minha gratidão e admiração pela competência ao técnico ALEXANDRE PIMENTEL e as doutorandas LILIANE PIRES e KALUCE GONÇALVES.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Sumário

Resumo.....	1
Abstract	3
Introdução	5
Hipótese	13
Objetivo	15
Casística e Métodos.....	17
Resultados	24
Discussão	32
Conclusão	39
Referências	41

Lista de abreviações

APACHE II – Acute Physiology and Chronic Health Evaluation

Ca – Cálcio

DMO – Disfunção de Múltiplos Órgãos

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ERNS – Espécies Reativas de Nitrogênio

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

GPx – Glutathione Peroxidase

HGQTAAS – Espectrofotometria de Absorção Atômica por Geração de Hidretos Acoplados a Célula de Quartzo

K – Potássio

Mg – Magnésio

Na – Sódio

P – Fósforo

PaO₂/FiO₂ – Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial sobre fração inspirada de oxigênio

PCR – Proteína C Reativa

RDA – Recomendação de Ingestão Diária

Se – Selênio

SIRS – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

SOFA – Sequential Organ Failure Assessment

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

Resumo

O estresse oxidativo, é reconhecido como característica fundamental no choque séptico. Além disso, em pacientes com resposta inflamatória sistêmica, a concentração de selênio no plasma diminui independentemente do seu estado nutricional. No entanto, o papel fisiopatológico da concentração de selênio em pacientes com choque séptico permanece desconhecido. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a associação da concentração de selênio no plasma e eritrócito com a atividade da glutathiona peroxidase (GPx1), o polimorfismo Pro198Leu da GPx1 e a mortalidade na unidade de terapia intensiva (UTI) e hospitalar em pacientes com choque séptico.

Trata-se de um estudo clínico observacional e prospectivo realizado em três unidades de terapia intensiva em um hospital universitário. Foram avaliados 110 pacientes consecutivos, maiores de 18 anos ($57,6 \pm 15,9$ anos; 63,6% homens), com choque séptico na admissão ou durante sua internação na UTI, entre Janeiro a Agosto de 2012.

No momento da coleta dos pacientes, foram registrados os dados demográficos. Amostras de sangue foram coletadas nas primeiras 72 horas após a admissão do paciente ou dentro de 72 horas do diagnóstico de choque séptico para determinação do estado nutricional de selênio, concentração de grupos carbonila, atividade da GPx1 e a genotipagem do polimorfismo Pro198Leu. Em relação ao estado nutricional de selênio, somente a concentração de selênio no eritrócito foi menor nos pacientes que evoluíram ao óbito durante a internação na UTI e hospitalar. A frequência dos genótipos para o polimorfismo Pro198Leu foram 55%, 38% e 7% para os alelos Pro/Pro, Pro/Leu e Leu/Leu, respectivamente. A atividade da GPx1 foi diferente entre os grupos e maior no genótipo Leu/Leu. No modelo de regressão de Cox, a concentração de selênio no eritrócito foi associada com a mortalidade na UTI (HR:0,965; 95%CI:0,943-0,988; p: 0,002) e hospitalar (HR: 0,968; 95%CI: 0,948-0,989; p: 0,003) em pacientes com choque séptico, mesmo após ajustado para idade, sexo e APACHE II.

A concentração de selênio no eritrócito foi preditora de mortalidade na UTI e hospitalar em pacientes com choque séptico. No entanto, este efeito não foi dependente da atividade da GPx1 ou do polimorfismo Pro198Leu.

Abstract

The oxidative stress is recognized as a key feature of septic shock. In addition, in patients with systemic inflammatory response, plasma selenium concentration falls independently of selenium status. However, the pathophysiologic role of selenium concentration in patients with septic shock remains unknown. Therefore, the objective of this study was to evaluate the association of erythrocyte and plasma selenium concentration with glutathione peroxidase (GPx1) activity, GPx1 polymorphisms and with intensive care unit (ICU) and hospital mortality in septic shock patients.

This is an prospective, observational clinical study held in three intensive care units in a university hospital. A total of 110 consecutive patients older than 18 y ($57,6 \pm 15,9$ y; 63,6% males) with septic shock on admission or septic shock during their ICU stay who were admitted to the ICU between January and August 2012 were evaluated.

At the time of the patients' enrollment, demographic information was recorded. Blood samples were taken within the first 72 h of the patient's admission or within 72 h of the septic shock diagnosis for determination of selenium status, protein carbonyl concentration, GPx1 activity and GPx1 Pro198Leu polymorphism genotyping. Regarding selenium status, only erythrocyte selenium concentration was lower in septic patients who died in ICU and hospital. The genotype frequencies for GPx1 Pro198Leu polymorphism were 55%, 38% and 7% for Pro/Pro, Pro/Leu and Leu/Leu, respectively. GPx1 activity was different between groups and was higher in the Leu/Leu genotype. In the Cox regression models, erythrocyte selenium concentration was associated with ICU (HR:0.965; 95%CI:0.943-0.988; p: 0.002) and hospital mortality (HR: 0.968; 95%CI: 0.948-0.989; p: 0.003) in patients with septic shock even after adjustment for age, gender and APACHE II.

Erythrocyte selenium concentration was a predictor of ICU and hospital mortality in patients with septic shock. However, this effect was not due to GPx1 activity or Pro198Leu polymorphism.

Introdução

A sepse é síndrome clínica resultante da interação entre o agente infeccioso e a resposta imunológica do hospedeiro. Essa interação resulta em produção exacerbada de citocinas, responsáveis pelo desenvolvimento da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). Esta por sua vez, pode evoluir tanto para cura como para disfunção de múltiplos órgãos (DMO) e óbito.¹

Diversas são as causas da SIRS, mas quando esta ocorre devido a processo infeccioso presumido ou evidente confirma-se o diagnóstico de sepse. A associação de sepse com hipoperfusão tecidual (hipotensão arterial, lactato acima do limite de normalidade; débito urinário < 0,5 mL/kg/h por mais de duas horas apesar de reposição volêmica adequada; $Pao_2/Fio_2 < 250$ na ausência de pneumonia ou $Pao_2/Fio_2 < 200$ na presença de pneumonia como foco de infecção; creatinina > 2,0 mg/dL; bilirrubina > 2,0 mg/dL; plaquetas totais < 100.000 μ L e tempo de protrombina > 1,5 RNI) que melhora após adequada ressuscitação volêmica caracteriza a sepse grave.¹ Já o choque séptico é definido como quadro de sepse grave, com manutenção da hipotensão apesar de adequada reposição volêmica e necessidade de drogas vasoconstritoras.¹

Embora a mortalidade do choque séptico tenha diminuído ao longo da última década em grande parte proporcionado pelo diagnóstico precoce, intervenções e cuidados de suporte, as taxas continuam bastante elevadas.² Dados sobre a frequência e evolução da sepse em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) da América Latina, incluindo o Brasil são raros. O Consenso Brasileiro de Sepse mostra frequência de sepse e choque séptico de 27% e 23%, respectivamente.³ Além disso, as taxas de mortalidade nos EUA variam entre 20% a 80% nos pacientes com choque séptico^{1,4}, com custos hospitalares superiores a 60 bilhões de dólares por ano.⁵

Entre os fatores que contribuem para essa elevada taxa podemos destacar o aumento do número de idosos; maior sobrevivência de pacientes imunossuprimidos e com doenças debilitantes; emprego mais frequente de técnicas invasivas (cateteres vesicais, tubos endotraqueais, cateteres intravasculares) e aumento das infecções hospitalares.^{3,6}

O processo fisiopatológico da sepse inicia-se com a invasão do hospedeiro por agentes infecciosos que podem ser bactérias, vírus ou fungos. Os

componentes da parede celular das bactérias gram-negativas, as bactérias gram-positivas, além da infecção fúngica são os principais ativadores da resposta inflamatória do hospedeiro, que apesar de importante para destruir os microorganismos invasores, pode aumentar de forma descontrolada e evoluir para choque séptico e DMO.⁷

Atualmente, as arteríolas e o endotélio vascular são vistos como os principais responsáveis pelas alterações hemodinâmicas no choque séptico. Inicialmente, ocorre vasodilatação intensa, que pode não responder de modo adequado à administração de agentes vasoconstritores. Esse fenômeno ocorre, principalmente, devido ao aumento na produção de óxido nítrico pelo endotélio vascular, hiperpolarização das membranas das células musculares lisas das arteríolas e à depleção dos estoques de vasopressina.¹ A queda da resistência vascular periférica leva à redução da pressão arterial sistêmica e conseqüentemente à redução da oferta de oxigênio aos tecidos. Por isso o choque séptico é definido como choque vasodilatador ou distributivo. No entanto, mesmo com a normalização da pressão arterial após a reposição de fluídos e drogas vasoconstritoras, a hipoperfusão tecidual pode perpetuar-se devido à disfunção endotelial e mitocondrial.^{1,8}

Além das alterações vasculares já comentadas, as células endoteliais quando ativadas diretamente pelas endotoxinas da membrana bacteriana ou por citocinas inflamatórias, adquirem função pró-coagulante e pró-trombótica, pelo aumento de liberação de tromboplastina e do fator de ativação plaquetário e pela diminuição da produção de trombomodulina. 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 também para as alterações regionais da perfusão tecidual observadas no choque séptico.^{1,8}

A hipóxia tecidual desvia o metabolismo da glicose para a glicólise anaeróbica e conseqüentemente há aumento da produção de lactato, sendo sua medida seriada útil para orientar a conduta e avaliar o prognóstico.¹

Atualmente, os cuidados e tratamento dos pacientes com choque séptico são protocolados pelo *Surviving Sepsis Campaign*.¹ O reconhecimento e

tratamento precoce e a utilização de protocolos baseados em evidências são os pilares para reduzir a morbimortalidade no choque séptico. As principais medidas no manejo atual incluem: diagnóstico rápido e adequado; reposição volêmica imediata e estabilização hemodinâmica; terapia precoce guiada por metas (*early goal directed therapy*); coleta de culturas apropriadas; antibioticoterapia precoce e de largo espectro, controle do foco infeccioso e controle glicêmico.⁹

Outras intervenções estão sendo estudadas no intuito de reduzir a morbimortalidade do choque séptico. Neste cenário a redução do estresse oxidativo é interessante alvo terapêutico.

O estresse oxidativo é cada vez mais reconhecido como fator central na fisiopatologia da sepse, especialmente no desenvolvimento de DMO. As espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) têm importantes papéis fisiológicos, em concentrações nanomolares, na modulação da sinalização, proliferação, apoptose e proteção celular. No entanto, quando em excesso EROs e ERNs também são capazes de lesar proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e ácidos graxos poliinsaturados, resultando em dano celular e disfunção dos tecidos.¹⁰

Em pacientes críticos, EROs podem ser produzidas principalmente a partir da disfunção mitocondrial, endotelial e da ativação da enzima NADPH oxidase como é classicamente observado no choque séptico.¹¹ Além disso, 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.¹²

No entanto, 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, catalase, glutathione peroxidase (GPx) e a tiorredoxina; e não enzimático como proteínas, ácido úrico, ácido ascórbico, selênio e o α -tocoferol. 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.¹³

Devido ao importante papel desempenhado pelo estresse oxidativo na sepse, a suplementação de antioxidantes nesses pacientes tem sido estudada na última década.^{14,15} Heyland et al. mostraram em uma meta-análise que a administração de antioxidantes, em especial altas doses de selênio (Se), como monoterapia ou associado a outros antioxidantes é estratégia segura e associada à redução da mortalidade em pacientes críticos.¹⁵

O Se é um micronutriente essencial para a saúde humana e pode ser encontrado nas formas inorgânica e orgânica. Na forma inorgânica é encontrado principalmente como selenato e selenito, sofrendo redução e transformando-se em selenido. Já na forma orgânica, destacam-se a selenometionina e a selenocisteína, que posteriormente também são transformados em selenido.¹⁶ Os seres humanos não sintetizam selenometionina, porém esta é absorvida a partir de fontes vegetais e suplementos alimentares. O selenito, selenato e selenocisteína são catabolizados até a forma de selenido. Este último, por sua vez, pode ser novamente metabolizado para selenofosfato, precursor de selenocisteína e de outras selenoproteínas.¹⁷

A biodisponibilidade do Se nas formas orgânica e inorgânica é relativamente alta, em torno de 70 a 95%, porém pode variar de acordo com a fonte alimentar e o estado nutricional do indivíduo.^{17,18} A excreção urinária de Se é a principal responsável pela homeostasia corporal do elemento, sendo que, quanto maior a ingestão dietética, maior é a sua excreção urinária.¹⁹

As melhores fontes alimentares de Se são de origem animal como as carnes, frutos do mar e laticínios. Já os vegetais apresentam concentrações variadas devido ao conteúdo do mineral no solo, além de haver diferenças no metabolismo entre vegetais e animais.²⁰ O alimento mais rico em Se é a castanha do Brasil, com concentrações em torno de 58 µg/g.²¹ A recomendação de ingestão diária (RDA) de Se para indivíduos adultos é de 55 µg/dia e o limite de ingestão tolerável é de 400 µg/dia.²⁰ O Se é armazenado no corpo humano sob diversas formas: como selenometionina nos músculos, esqueleto, eritrócitos, pâncreas, fígado, rins, estômago, cérebro, pele e mucosa gastrointestinal; no fígado, incorporado a glutathione peroxidase 1 (GPx1) e no plasma na forma livre ou ligado às selenoproteínas.²⁰

A intoxicação crônica em indivíduos adultos é rara e ocorre com ingestão superior a 800 µg/dia. A deficiência de Se pode ser encontrada em crianças chinesas, onde o seu teor no solo é baixo e a ingestão diária do mineral inferior a 10 µg/dia²², também em pacientes em hemodiálise²³, com doença de Alzheimer²⁴ e em pacientes críticos.²⁵⁻²⁸

As principais funções do Se estão relacionadas à sua ação antioxidante, participação na conversão de T4 em T3, proteção contra ação nociva de metais pesados e xenobióticos, fertilidade masculina e aumento da resistência do sistema imunológico.¹⁷

Alguns estudos mostraram baixas concentrações plasmáticas de Se nos pacientes críticos e encorajaram o desenvolvimento de estudos que avaliaram sua suplementação. Forceville et al. estudaram as concentrações de Se plasmático em 134 pacientes admitidos em UTI. No momento da admissão, houve correlação negativa entre os valores de Se e os valores do APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*) e do SAPS II (*Simplified Acute Physiology Score*), além disso, os pacientes com baixos valores de Se apresentaram mortalidade 3,5 vezes maior.²⁹ Outros estudos mostraram também redução da necessidade de hemodiálise, diminuição do SOFA (“Sequential Organ Failure Assessment”) e da mortalidade em pacientes críticos que receberam suplementação de Se.²⁹⁻³¹ No entanto, estudos de Berger et al. não mostraram diferença na mortalidade quando o Se foi suplementado.³²⁻³⁴

Em estudo multicêntrico realizado com 1200 pacientes críticos, Heyland sugeriu que doses maiores que 1000 µg/dia de Se podem ser prejudiciais e doses menores que 800 µg/dia podem não oferecer nenhum benefício.³⁵

Logo, apesar dos resultados promissores, a dose de suplementação, a via e o tempo de administração ainda não foram determinados. Provavelmente o estado nutricional do Se previamente à admissão na UTI e características individuais dos pacientes também influenciam a resposta à sua suplementação.

O estado nutricional do Se pode ser avaliado pela sua concentração corporal (sangue, plasma, soro, eritrócitos, cabelos, unhas ou urina) ou através da medição da atividade/concentração de certas selenoproteínas, como a GPx1.³⁶ Recomenda-se que sejam utilizados dois ou mais biomarcadores, de maneira a

evitar possíveis erros diagnósticos.³⁷ No entanto, em pacientes com resposta inflamatória sistêmica a concentração plasmática de Se diminui independentemente de seu estado nutricional.^{38,39} Em estudo recente com 91 pacientes críticos, Stefanowicz et al. mostraram que a concentração plasmática do Se é afetada pelo processo inflamatório, enquanto que a eritrocitária permanece normal.⁴⁰ Esses dados sugerem que a concentração eritrocitária de Se é melhor para avaliar seu estado nutricional nesses pacientes.

Outro método de análise do estado nutricional do Se é a medida da concentração ou atividade da GPx1. A GPx é uma enzima antioxidante capaz de metabolizar grande número de hidroperóxidos livres e catalisar a redução do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água.^{41,42} Foram descritas 5 GPxs dependentes de selênio (Se) em humanos: citosólica (GPx1); gastrointestinal (GPx2); plasmática (GPx3); fosfolípide hidroperóxido (GPx4) e no epitélio olfativo e em tecidos embrionários (GPx5).^{43,44}

A GPx1 é a selenoproteína mais abundante em humanos e encontra-se expressa em praticamente todos os tecidos. Esta enzima é conhecida como reserva corporal de Se, podendo ser utilizada para as necessidades imediatas desse nutriente. Além disso, dentre as diferentes GPxs, verifica-se que, as concentrações e atividade da GPx1 são mais sensíveis à deficiência dietética de Se. Observa-se em ratos, nesta condição, reduções de 99% no RNAm de GPx1 no fígado e redução de 90% em sua atividade.⁴⁵ Da mesma maneira, em células de carcinoma hepatocelular, a deficiência de Se resulta em reduções de 60% no RNAm da GPx1 e de 93% em sua atividade.⁴⁶ Por outro lado, ratos deficientes em Se, ao serem tratados com este mineral, apresentaram rápida normalização da expressão e atividade da GPx1.⁴⁵ Além das concentrações de Se, o polimorfismo Pro198Leu do gene da GPx1 parece também influenciar as concentrações e a atividade da enzima.

O polimorfismo Pro198Leu do gene da GPx1 está associado à substituição da citosina por timina no éxon 2 da GPx1, que resulta na mudança do aminoácido prolina (Pro) por leucina (Leu) no códon 198.⁴⁷ Esse polimorfismo é importante devido sua alta prevalência em caucasianos e a sua possível associação com a redução da atividade da GPx1.⁴⁷ Os estudos que investigaram a

associação entre a atividade da GPx1 e polimorfismo Pro198Leu, entretanto, são controversos. Estudos *in vitro* com células humanas de câncer de mama, células endoteliais aórticas bovinas e cardiomiócitos, revelaram que o alelo Leu está associado com menor atividade da enzima GPx1 quando o Se é adicionado ao meio de cultura.⁴⁸⁻⁵⁰

Estudos clínicos também mostraram que o alelo variante pode estar associado à redução da atividade da GPx1 e ao maior risco de câncer de mama.⁴⁷ Por outro lado, o alelo Leu apresentou efeito protetor contra o câncer de pulmão e de próstata, além de estar associado ao maior tempo para recorrência do câncer de bexiga.⁵¹⁻⁵³

Outros estudos não observaram diferenças na concentração de Se ou atividade da GPx1 entre os genótipos, mas mostraram que a associação entre atividade da enzima e a concentração de Se era diferente dependendo do genótipo analisado.^{54,21} Cominetti et al.²¹ em estudo randomizado com 37 mulheres obesas que receberam suplementação de Se através da ingestão diária de uma castanha do Brasil, observaram que após a suplementação, houve aumento nas concentrações de Se e da atividade da GPx1, independentemente do polimorfismo Pro198Leu. No entanto, indivíduos com o alelo Leu apresentaram maior lesão do DNA após a suplementação de Se quando comparados com indivíduos sem o polimorfismo. Esses dados sugerem que a resposta à suplementação de Se possa ser diferente dependendo do polimorfismo Pro198Leu.²¹

Em pacientes com choque séptico as relações entre o polimorfismo Pro198Leu do gene GPx1, sua atividade enzimática e a concentração de Se no plasma e eritrócitos ainda não foram estudadas.

Hipótese

Formulamos a hipótese de que a baixa concentração de Se tanto no plasma quanto no eritrócito, associada ao polimorfismo Pro198Leu, reduzem a atividade da GPx1, favorecendo o aumento da mortalidade em pacientes com choque séptico.

Objetivo

Avaliar se a concentração de selênio tanto no plasma como no eritrócito e o polimorfismo Pro198Leu do gene da GPx1 interferem na mortalidade de pacientes com choque séptico.

Casuística e Métodos

Delineamento

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da nossa Instituição e o termo de consentimento livre e esclarecido de todos os pacientes foi obtido através da assinatura do familiar/responsável. Para o cálculo do tamanho amostral foi utilizada a fórmula de Fisher e Belle, com as seguintes variáveis: taxa de mortalidade no choque séptico de 50%, intervalo de confiança de 95%, erro amostral de 10%, totalizando 96 pacientes.

Foram avaliados prospectivamente 110 pacientes consecutivos com diagnóstico de choque séptico na admissão ou durante a permanência na UTI, maiores de 18 anos, internados no Centro de Terapia Intensiva (CTI) ou no Serviço de Terapia Intensiva (SETI) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), totalizando 28 leitos de internação, durante o período de Janeiro a Agosto de 2012. Os critérios de exclusão foram: gestantes, pacientes com morte encefálica confirmada, atraso no diagnóstico (tempo maior que 72 horas) e hipoperfusão tecidual com necessidade de droga vasoativa por tempo inferior a 24 horas.

Na admissão dos pacientes foram registrados dados demográficos e clínicos, os escores de gravidade APACHE II e SOFA, além dos exames bioquímicos. Além disso, a coleta de sangue foi realizada nas primeiras 72 horas da admissão do paciente ou até 72 horas após o diagnóstico de choque séptico para determinação do estado nutricional do Se, concentração dos grupos carbonila, atividade da GPx1 e genotipagem do polimorfismo Pro198Leu.

O choque séptico foi definido como infecção induzindo a resposta inflamatória sistêmica, com pressão arterial sistólica inferior a 90 mmHg; pressão arterial média inferior a 70 mmHg ou hipoperfusão tecidual e com necessidade de introdução de drogas vasopressoras.¹ Todos os pacientes foram acompanhados diariamente durante a internação na UTI até a alta hospitalar ou óbito. As taxas de mortalidade hospitalar e na UTI foram registradas.

Análises laboratoriais

As análises laboratoriais referentes à concentração de selênio no sangue, atividade eritrocitária da GPx1 e o polimorfismo Pro198Leu da GPx1 foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Minerais do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental - USP/São Paulo. A análise da concentração da proteína carbonila foi realizada no Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências (IB) da UNESP/Botucatu e os exames bioquímicos foram realizados durante a própria rotina de internação dos pacientes do Hospital das Clínicas da FMB/UNESP.

Os exames bioquímicos séricos realizados foram: sódio, potássio, magnésio, fósforo, cálcio total, glicemia, uréia, 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); gasometria arterial e lactato (Roche OMNI® S Blood Gas Analyzer).

Coleta de Materiais Biológicos

Aproximadamente 20 mL de sangue foram coletados de cada paciente em até 72 horas após a confirmação do diagnóstico de choque séptico na UTI. Cerca de 15 mL de sangue foram transferidos para tubos com anticoagulante EDTA e 5 mL para tubos sem anticoagulante para obtenção do soro. O plasma foi separado do sangue total por centrifugação em 3000 x g durante 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. Após esse procedimento foram acondicionados em tubos de polipropileno desmineralizados, sendo a seguir armazenados a -80°C. O soro foi obtido também por centrifugação dos tubos em temperatura ambiente a 3000 x g durante 15 minutos e armazenado da mesma maneira que o plasma. Para extração do DNA, alíquotas de 1 mL de sangue total foram acondicionadas em tubos autoclavados e armazenadas a -80°C.

A separação dos eritrócitos seguiu o método padronizado por Whitehouse et al.⁵⁵ A massa eritrocitária obtida do sangue total foi lavada 3 vezes com 5 mL de solução fisiológica. Posteriormente homogeneizada lentamente por inversão e centrifugada 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 armazenado em tubos desmineralizados a -80°C. Todas as amostras biológicas foram devidamente identificadas e permaneceram armazenadas na Unidade de Pesquisa Experimental (Unipex) da FMB/UNESP até análises.

Visando a redução da contaminação por minerais, todos os vidros, frascos e recipientes utilizados para análise do Se foram desmineralizados em banho de ácido nítrico a 20% por 12 horas e enxaguados 10 vezes em água ultrapura. Todos os reagentes utilizados apresentaram grau de pureza analítica (PA) e a água utilizada no preparo das soluções e diluições das amostras foi sempre ultrapura.

Determinação do selênio no plasma e eritrócitos

Para a análise da concentração sanguínea do Se, alíquotas de plasma e de eritrócitos (300 µL) foram transferidas para tubos de micro Kjeldhal com posterior adição de 5 mL de ácido nítrico a 68% PA. Os tubos foram deixados *overnight*, durante 12 horas, em seguida colocados em blocos digestores com temperatura inicial de 50°C e gradativamente aumentados até alcançar 150°C. Após a digestão completa do material orgânico, cerca de 4-6 horas para o plasma e 7-14 horas para os eritrócitos, as soluções foram reduzidas de Se VI para Se IV com o acréscimo de 5 mL de HCl 1,2 N e aquecimento durante 2 horas em até 100°C nos mesmos blocos digestores. Em balões volumétricos, as amostras eram diluídas para 25 mL com água ultrapura, criado a curva de calibração com concentrações de 0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mg/L de Se e submetidas a leitura por espectrofotometria de absorção atômica por geração de hidretos acoplados a célula de quartzo (HGQTAAS).⁵⁶

Para controle da metodologia da análise de Se, utilizou-se o material de referência certificado *Seronorm Serum* para determinação plasmática e *Seronorm Whole Blood* para determinação eritrocitária. Estes foram preparados por digestão ácida idêntica ao adotado para as amostras biológicas. Todas as amostras foram realizadas em duplicata e o valor médio utilizado para análise estatística. As concentrações de Se no sangue foram expressas em $\mu\text{g/L}$ e considerados adequados os valores entre 84 e 100 $\mu\text{g/L}$ para o plasma⁵⁷ e de 60 a 120 $\mu\text{g/L}$ para os eritrócitos.⁵⁸

Análise da atividade eritrocitária total da enzima GPx 1

A atividade total da GPx1 foi determinada nos eritrócitos com auxílio de kit comercial (Ransel 550 - RANDOX Laboratories, Crumlin/UK) em analisador bioquímico automático (Labmax 240, Labtest). O método se baseia na oxidação da glutathiona reduzida por um hidroperóxido, catalisada pela GPx. Na presença da enzima e do cofator NADPH, a glutathiona oxidada é imediatamente convertida à forma reduzida com a oxidação concomitante do NADPH em NADH⁺.⁵⁹

Foram adicionados 50 μL de eritrócitos em tubos previamente identificados e em seguida foi acrescentado 1 mL de diluente. Após 5 minutos foi adicionado 1 mL de solução de Drabkin. A leitura da absorbância foi feita em até 20 minutos, tendo o seu valor multiplicado pelo fator de diluição e corrigido pela concentração de hemoglobina. A dosagem da hemoglobina foi realizada pelo método de cianometahemoglobina com o Kit LABTEST® e lido em espectrofotômetro UV visível Genesys® 20, em comprimento de onda de 540 nm. A concentração de hemoglobina do hemolisado foi determinada para que o resultado final fosse expresso em unidades de enzima por grama de hemoglobina (U/gHb). Foram considerados adequados os valores de referência do fabricante (27,5 - 73,6 U/g Hb).

Determinação do polimorfismo Pro198Leu no gene da enzima GPx1

A extração do DNA foi realizada através do kit Purelink Genomic DNA, da Invitrogen, Life Technologies. O DNA extraído foi alíquotado e armazenado à -20°C em microtubos de polipropileno autoclavados. Posteriormente, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop, sendo o resultado expresso em ng/mL. Utilizou-se a razão 260/280 superior a 1,7 e inferior a 2,0, como parâmetro de qualidade do DNA. Amostras com a razão abaixo desse valor foram reextraídas. Em seguida, o DNA genômico de todas as amostras foi ajustado em água autoclavada para uma concentração de 10 ng/mL e volume final de 20 µL. Um total de 2 µL de DNA foi usado para a reação em cadeia da polimerase e 18 µL de solução contendo o master mix específico para o ensaio de genotipagem (Taqman® genotyping master mix - Applied Biosystems®) com sondas Taqman (Custom Taqman® SNP Genotyping Assay, Human; Alelo 1: VIC/MGB-NFQ; Alelo 2: FAM/MGB-NFQ; *part number*4331349) e primers (FORWARD=5'-TGCCCCTACGCAGGTACA-3'; REVERSE=5'-TCCCAAATGACAATGACACAG-3') específicos para o SNP (rs 1050450) estudado.⁶⁰ A genotipagem da população do estudo foi realizada pelo sistema TaqMan SNP Genotyping Assays, da Applied Biosystems, utilizando as condições de termociclagem recomendadas pelo fabricante (desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos; seguida de 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 58°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos; com extensão final a 72°C por 10 minutos). Este sistema é baseado na análise *end-point* da RT-PCR (Real time - PCR, ou Reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real).

Determinação de grupos carbonila

As concentrações de grupos carbonila nas proteínas foram analisadas baseadas na reação com dinitrofenil-hidralazina (DNPH) e na formação das bases de Schiff de acordo com o método descrito por Reznick e Packer.⁶¹ A

concentração dos grupos carbonila foi quantificada por espectrofotômetro a 360 nm usando um coeficiente de 22000 M⁻¹.cm⁻¹.

Análise estatística

Os dados foram apresentados em média \pm desvio padrão ou mediana e intervalo interquartilico. Para comparação entre dois grupos, quando as variáveis contínuas apresentaram distribuição paramétrica foi utilizado o teste t de Student e quando apresentaram distribuição não paramétrica o teste de Mann-Whitney. Para comparações entre três grupos, quando as variáveis contínuas apresentaram distribuição paramétrica foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) e quando apresentaram distribuição não paramétrica foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn. Para avaliar a associação entre a GPx1, grupos carbonila e concentração de Se no eritrócito entre os diferentes genótipos foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Para as variáveis categóricas utilizamos o teste de χ^2 ou teste exato de Fisher. O modelo de risco proporcional de Cox foi utilizado para avaliar a mortalidade na UTI e hospitalar. Nesses modelos a concentração de Se nos eritrócitos foi testada como variável independente e ajustada para sexo, idade e APACHE II. Essas variáveis foram escolhidas devido à importância clínica das mesmas na mortalidade dos pacientes com choque séptico.

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

Durante a pesquisa, 14 pacientes foram excluídos, sendo 6 devido ao óbito imediato e 8 por atraso no diagnóstico. Logo avaliamos prospectivamente 110 pacientes com diagnóstico de choque séptico, com idade média de $57,6 \pm 15,9$ anos, sendo 63,6% do sexo masculino. A mediana do tempo de internação na UTI e hospitalar foi de 7 (3-13) e 13 (4-22) dias respectivamente. As taxas de mortalidade na UTI e hospitalar foram de 54,5% e 63,6% respectivamente. Em relação à procedência, 42% dos pacientes foram provenientes do pronto socorro, 35% de enfermarias e 23% do centro cirúrgico. Além disso, 57% dos pacientes apresentaram infecção de foco pulmonar, 24% de foco abdominal, 10% de foco urinário e 9% de foco cutâneo.

As tabelas 1 e 2 resumizam os dados demográficos e laboratoriais em relação à mortalidade na UTI e hospitalar. Em ambas as mortalidades, não houve diferença estatística em relação à idade e sexo entre sobreviventes e não sobreviventes, no entanto, tiveram maiores valores de APACHE II e SOFA, maiores concentrações séricas de lactato e uréia os pacientes que evoluíram ao óbito. Além disso, estes pacientes tiveram menor concentração sérica de albumina e menor tempo de internação na UTI e hospitalar. Não houve diferença em relação aos demais exames bioquímicos.

Tabela 1. Dados demográficos e laboratoriais de 110 pacientes com choque séptico.

Variável	Mortalidade na UTI		Valor de p
	Sim (n = 60)	Não (n = 50)	
Idade, (anos)	58,8 ± 15,7	56,2 ± 16,2	0,395
Homens, n(%)	36 (60%)	34 (68%)	0,503
APACHE II	21,9 ± 7,4	17,7 ± 6,7	0,003
SOFA	10,0 (7,3 -12,0)	9,0 (7,0 – 10,0)	0,032
Lactato (mmol/L)	2,2 (1,3 - 3,8)	1,6 (1,1 - 2,2)	0,007
Hemoglobina (g/dL)	10,9 ± 2,3	11,2 ± 2,4	0,534
Hematócrito (%)	32,8 ± 6,7	33,8 ± 7,2	0,429
Leucócitos (10 ³ /mm ³)	16,1 (10,6 – 21,1)	12,7 (9,2 -17,5)	0,070
Na (mmol/L)	142 (137- 147)	140 (137 - 146)	0,286
K (mmol/L)	4,2 (3,8 - 4,7)	4,1 (3,6 - 4,8)	0,631
P (mg/dL)	4,4 (3,4 - 5,4)	3,7 (2,8 - 4,6)	0,073
Ca (mg/dL)	7,6 (7,0 - 8,3)	8,0 (7,5 - 8,3)	0,115
Mg (mg/dL)	2,1 (1,8 - 2,3)	1,9 (1,7- 2,2)	0,118
Glicemia (mg/dL)	180 (121 - 247)	177 (129- 248)	0,977
PCR (mg/dL)	23,0 (8,0 – 31,5)	23,0 (6,5 - 36,0)	0,511
Albumina (g/dL)	2,0 (1,7 - 2,5)	2,6 (2,1 – 3,0)	0,002
Uréia (mg/dL)	96,5 (52,3 – 138,5)	54,5 (42,0 – 92,5)	0,004
Creatinina (mg/dL)	1,3 (0,7 - 2,5)	1,1 (0,6 - 2,5)	0,418
Tempo UTI (dias)	5 (2 -9)	9,5 (5 -16)	<0,001
Tempo internação (dias)	5 (2 -9)	22 (15 - 34)	<0,001

APACHE II – *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*; SOFA – *Sequential Organ Failure Assessment*; Na – sódio; K – potássio; P – fósforo; Ca – cálcio; Mg – magnésio; PCR – proteína C reativa; 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, χ^2 ou exato de Fisher.

Tabela 2. Dados demográficos e laboratoriais de 110 pacientes com choque séptico.

Variável	Mortalidade hospitalar		Valor de p
	Sim (n = 70)	Não (n = 40)	
Idade, (anos)	59,3 ± 15,5	54,5 ± 16,5	0,126
Homens, n(%)	41 (58,6%)	29 (72,5%)	0,210
APACHE II	21,4 ± 7,2	17,4 ± 7,1	0,006
SOFA	10,0 (8,0 - 12,0)	9,0 (7,0 - 10,0)	0,026
Lactato (mmol/L)	2,2 (1,3 - 3,9)	1,4 (1,0 - 2,0)	0,001
Hemoglobina (g/dL)	10,8 ± 2,3	11,3 ± 2,4	0,328
Hematócrito (%)	32,5 ± 6,6	34,4 ± 7,4	0,171
Leucócitos (10 ³ /mm ³)	15 (10 - 21)	13 (9 - 17)	0,223
Na (mmol/L)	141 (138 - 147)	140 (137 - 145)	0,226
K (mmol/L)	4,2 (3,6 - 4,7)	4,2 (3,8 - 5,0)	0,343
P (mg/dL)	4,4 (3,4 - 5,4)	3,8 (2,8 - 4,6)	0,163
Ca (mg/dL)	7,7 (7,1 - 8,2)	8,0 (7,5 - 8,4)	0,094
Mg (mg/dL)	2,1 (1,8 - 2,3)	1,9 (1,7 - 2,2)	0,119
Glicemia (mg/dL)	180 (112 - 244)	178 (139 - 250)	0,648
PCR (mg/dL)	23,0 (8,0 - 31,0)	24,0 (6,6 - 37,5)	0,735
Albumina (g/dL)	2,1 (1,7 - 2,6)	2,6 (2,2 - 3,1)	0,001
Uréia (mg/dL)	92,5 (49,8 - 133,5)	53,5 (42,3 - 92,0)	0,007
Creatinina (mg/dL)	1,3 (0,7 - 2,5)	1,0 (0,7 - 2,8)	0,619
Tempo UTI (dias)	6 (3 - 10)	10 (4 - 16)	0,004
Tempo internação (dias)	6 (3 - 14)	21 (15 - 34)	<0,001

APACHE II – *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*; SOFA – *Sequential Organ Failure Assessment*; Na – sódio; K – potássio; P – fósforo; Ca – cálcio; Mg – magnésio; PCR – proteína C reativa; 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, χ^2 ou exato de Fisher.

Em relação ao Se no plasma, os pacientes tiveram concentração média de 23,40 ± 9,03 µg/L e nenhum dos indivíduos avaliados apresentou concentração dentro dos valores de normalidade. Apesar disso, não houve associação da concentração de Se no plasma com a mortalidade tanto na UTI quanto hospitalar (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Concentrações de Se no plasma e eritrócitos, atividade da GPx1 e concentração dos grupos carbonila em pacientes com choque séptico.

Variável	Mortalidade na UTI		Valor de p
	Sim (n = 60)	Não (n = 50)	
Se plasma ($\mu\text{g}/\text{IL}$)	23,6 \pm 9,4	23,1 \pm 8,7	0,787
Se eritrócito ($\mu\text{g}/\text{L}$)	29,9 \pm 12,1	36,4 \pm 10,8	0,005
GPx1 (U/g Hb)	30,1 (20,8 - 37,1)	31,2 (26,1 - 39,0)	0,301
G. carbonila(nmol/mL)	14,6(5,2 - 26,1)	5,4 (3,4 - 21,0)	0,021

Se – selênio; G. – grupos; GPx1 – glutathione peroxidase 1. Foram utilizados os testes t de Student, Mann-Whitney.

Tabela 4. Concentrações de Se no plasma e eritrócitos, atividade da GPx1 e concentração dos grupos carbonila em pacientes com choque séptico.

Variável	Mortalidade hospitalar		Valor de p
	Sim (n = 70)	Não (n = 40)	
Se plasma ($\mu\text{g}/\text{IL}$)	23,3 \pm 9,1	23,5 \pm 9,1	0,932
Se eritrócito ($\mu\text{g}/\text{L}$)	30,7 \pm 11,7	36,6 \pm 11,4	0,014
GPx1 (U/g Hb)	30,4 (22,4 -36,5)	30,6 (24,9 – 39,1)	0,636
G. Carbonila (nmol/mL)	13,8(5,1-25,7)	5,3(3,2 -22,5)	0,053

Se – selênio; P. – grupos; GPx1 – glutathione peroxidase 1. Foram utilizados os testes t de Student, Mann-Whitney.

A concentração média de Se nos eritrócitos foi de $32,8 \pm 11,9 \mu\text{g}/\text{L}$, sendo que apenas um paciente atingiu o valor de normalidade. Além disso, os pacientes que evoluíram ao óbito na UTI tiveram menores valores de Se eritrocitário quando comparados aos sobreviventes ($p = 0,005$) (Tabela 3) e também na mortalidade hospitalar ($p = 0,014$) (Tabela 4).

Em relação à GPx1, sua atividade foi de $30,6 (24,0 - 38,4) \text{ U/gHb}$, sendo que 33,3% dos pacientes analisados tiveram atividade da enzima abaixo do valor de referência. A atividade eritrocitária da GPx1 não teve relação com a mortalidade. (Tabelas 3 e 4) No entanto, o estresse oxidativo, avaliado pela concentração de grupos carbonila nas proteínas, foi maior nos pacientes que evoluíram ao óbito, mas em relação à mortalidade hospitalar a diferença não atingiu significância estatística. (Tabelas 3 e 4)

O polimorfismo Pro198Leu da GPx1 foi avaliado em 104 pacientes devido problemas técnicos com as amostras. Dentre os pacientes do estudo, 57 apresentaram genótipo selvagem, ou seja, eram homocigotos para prolina; 40 apresentaram o genótipo heterocigoto prolina/leucina; e 7 eram homocigotos para leucina. (Tabela 5) A prevalência dos genótipos nesta população está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, o qual se refere ao princípio do equilíbrio gênico, ou seja, se nenhum fator evolutivo ocorrer em uma população, as frequências alélicas permanecerão constantes ao passar das gerações. As frequências observadas foram citadas acima e as esperadas foram 55%; 38% e 7%; com uma frequência de variação alélica de 0,26 ($\chi^2 = 0$; $p = 0,74$).

Na tabela 6, podemos observar a concentração de Se eritrocitário, atividade da GPx1, concentração dos grupos carbonila e mortalidade na UTI e hospitalar de acordo com cada genótipo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando analisado a concentração de Se e a mortalidade. A concentração dos grupos carbonila foi menor nos grupos Pro/Leu e Leu/Leu quando comparado ao grupo Pro/Pro, porém, sem diferença estatística. Além disso, a atividade eritrocitária da GPx1 foi diferente entre os genótipos, sendo maior no grupo Leu/Leu ($p = 0,045$).

Não foi encontrada associação entre a concentração de Se eritrocitário com a atividade da GPx1 e a concentração dos grupos carbonila, quando analisados separadamente para cada genótipo (Tabela 7).

Tabela 5. Distribuição do polimorfismo Pro198Leu no gene que codifica para a GPx1 em pacientes com choque séptico.

Genótipos – códon 198 da GPx1	n (%)
Pro/Pro	57 (55%)
Pro/Leu	40 (38%)
Leu/leu	7 (7%)

Tabela 6. Valores de Selênio nos eritrócitos, atividade eritrocitária da GPx1, concentração dos grupos carbonila e mortalidade de acordo com os genótipos.

	Pro/Pro (n = 57)	Pro/Leu (n = 40)	Leu/Leu (n = 7)	Valor de p
Se eritrócito (µg/L)	32,3 ± 12,2	33,1 ± 10,9	36,6 ± 9,7	0,655
GPx1 (U/g Hb)	28,5 (19,8-36,7)	31,1(27,7-41,0)	35,9 (24,7-51,5)	0,045
G. Carbonila (nmol/mL)	13,5 (4,6 -24,2)	7,5 (4,4-25,7)	5,3 (3,1-17,5)	0,403
Óbito na UTI n(%)	27 (47%)	26 (65%)	4(57%)	0,227
Óbito hospitalar n(%)	31 (54%)	30 (75%)	5 (71%)	0,105

Se – selênio; G. – grupos; GPx1 – glutatona peroxidase 1. Foram utilizados os testes ANOVA, Kruskal-Wallis, χ^2 ou exato de Fisher.

Tabela 7. Associação da concentração de Selênio eritrocitário com atividade da GPx1 e concentração dos grupos carbonila de acordo com os genótipos.

	Pro/Pro		Pro/Leu		Leu/Leu	
	Se eritrócito (µg/L)					
	r	p	r	p	r	p
GPx1 (U/g Hb)	0,231	0,110	0,145	0,389	0,214	0,602
G. Carbonila(nmol/mL)	-0,219	0,121	-0,080	0,650	-0,179	0,660

Se – selênio; G. – grupos; GPx1 – glutatona peroxidase 1. Foi utilizado o teste de correlação de Spearman.

A análise proporcional de Cox para mortalidade na UTI está apresentada na Tabela 8. A menor concentração de Se no eritrócito esteve relacionada com aumento da mortalidade na UTI mesmo quando ajustada pelo gênero, idade e APACHE II (HR: 0,965; IC 95%: 0,943-0,988; p = 0,002) De maneira semelhante a menor concentração de Se no eritrócito foi preditora de mortalidade hospitalar, mesmo após ajuste para o gênero, idade e APACHE II. (HR: 0,968; IC 95%: 0,948-0,989; p = 0,003) (Tabela 9).

Tabela 8. Modelos proporcionais de Cox para mortalidade na UTI.

Variável	HR	IC 95%	Valor de p
Se eritrócito ($\mu\text{g/L}$)	0,976	0,955 - 0,997	0,028
Se eritrócito ($\mu\text{g/L}$)*	0,965	0,943 - 0,988	0,002
Se eritrócito ($\mu\text{g/L}$)**	0,965	0,944-0,988	0,002

*Ajustado para gênero, idade e APACHE II.

**Ajustado para gênero e APACHE II.

Tabela 9. Modelos proporcionais de Cox para mortalidade hospitalar.

Variável	HR	IC 5 - 95%	Valor de p
Se eritrócito ($\mu\text{g/L}$)	0,979	0,959-0,999	0,041
Se eritrócito ($\mu\text{g/L}$)*	0,968	0,948-0,989	0,003
Se eritrócito ($\mu\text{g/L}$)**	0,968	0,948-0,989	0,003

*Ajustado para gênero, idade e APACHE II.

**Ajustado para gênero e APACHE II.

Discussão

O objetivo desse trabalho foi avaliar se a concentração de Se tanto no plasma quanto no eritrócito e o polimorfismo Pro198Leu da GPx1 interferem na mortalidade de pacientes com choque séptico. Nossos resultados sugerem que a baixa concentração de Se eritrocitário contribui para o aumento da mortalidade na UTI e hospitalar, porém sem influência do polimorfismo ou da atividade da GPx1.

O choque séptico é considerado um dos principais problemas de saúde pública, afetando milhões de pessoas em todo o mundo.^{62,63} No entanto, apesar do avanço no conhecimento da sua fisiopatologia, as taxas de mortalidade continuam elevadas, estando as nossas taxas de acordo com os dados da literatura.^{1,4,62,63} Como esperado, os pacientes que morreram durante a internação foram mais graves e tiveram maior disfunção orgânica, comprovado pelos elevados valores séricos dos grupos carbonila e também pelos maiores valores dos índices de gravidade APACHE II e SOFA. Além disso, estes pacientes tiveram menor tempo de internação na UTI e hospitalar. Acreditamos que esse fato ocorreu, pois em nosso estudo os pacientes mais graves morreram mais precocemente.

Diversos trabalhos vêm demonstrando aumento da atividade oxidante ou diminuição das defesas antioxidantes em pacientes críticos.⁶⁴⁻⁶⁹ A atividade oxidante pode ser avaliada por diversas formas, dentre elas, o dano oxidativo proteico, obtido através da concentração sérica dos grupos carbonila, mostra-se um bom marcador.⁷⁰ O estresse oxidativo aumentado nos nossos pacientes pode ser observado pela maior concentração dos grupos carbonila, sendo cerca de 2,5 vezes maior nos indivíduos que evoluíram ao óbito. Esses dados reforçam a importância do estresse oxidativo nos pacientes com choque séptico.

Na última década, com o intuito de atenuar o estresse oxidativo, estudos com a suplementação de elementos traço e vitaminas em pacientes críticos tem sido realizados. Entre esses micronutrientes o selênio merece destaque. Em estudo multicêntrico, randomizado e duplo cego, pacientes com choque séptico foram suplementados com Se na forma selenito de sódio (4000 µg no primeiro dia e 1000 µg/dia nos 9 dias seguintes) em infusão contínua. A

suplementação foi bem tolerada, sem efeitos adversos, porém não houve resultados estatisticamente significantes em relação ao óbito na UTI. Os autores levantaram a hipótese de que esse resultado, talvez seja causado pela administração em infusão contínua ao invés da infusão em bolus, como administrado em outros estudos.⁷¹ Outros trabalhos, também não encontraram evidências do efeito da suplementação de Se sobre a redução da mortalidade.³²⁻

34,72

Por outro lado, alguns trabalhos encontraram esta associação.^{15,29-31} Heyland et al.¹⁵, observaram que a suplementação de Se (sozinha ou em combinação com outros antioxidantes) esteve associada com redução da mortalidade. Além disso, os estudos que utilizaram doses mais elevadas de Se (500 - 1000 µg/dia) foram eficazes em reduzir a mortalidade, enquanto aqueles que utilizaram doses menores (< 500 µg/dia) não tiveram nenhum efeito.¹⁵ Entretanto, os autores concluíram que doses maiores não foram necessariamente melhores, devido às propriedades pró-oxidantes do selenito de sódio. Estas propriedades podem ter benefício inicial na evolução do choque séptico se atuarem na redução da inflamação ou inibição da ativação do NF-κB.⁷¹ Porém, em determinada concentração, o efeito pró-oxidante do selenito pode ser tóxico para os seres humanos devido à sua capacidade pró-oxidante em catalisar a oxidação de tióis e simultaneamente gerar superóxido, causando assim depleção intracelular de glutathione, estresse oxidativo excessivo e morte celular, sendo a toxicidade do Se claramente dose dependente.⁷³

Apesar dos resultados promissores, mais estudos são necessários para se determinar a dose de suplementação, a via e o tempo de administração.^{14,15,74} Nós acreditamos que o estado nutricional do Se prévio a admissão na UTI e o polimorfismo Pro198Leu da GPx1 podem influenciar a suplementação de selênio nesses pacientes.

O Se é componente essencial de diversas selenoproteínas participando dessa maneira das defesas antioxidantes do organismo. Mais de vinte e cinco selenoproteínas já foram identificadas, sendo que a GPx, a fosfohidroxil-glutathione peroxidase e a tioredoxina redutase merecem destaque.^{22,44} É importante lembrar que para exercerem suas atividades antioxidantes, essas

enzimas necessitam de um átomo de selênio na forma de selenocisteína em seus sítios ativos.^{71,75} Em indivíduos saudáveis a selenoproteína P é a mais abundante no plasma, representando 52% do total de selênio. A glutathiona peroxidase representa 39%, a albumina 9% e o selênio livre no plasma menos de 1% do total deste micronutriente.⁷⁵

A avaliação do estado nutricional relativo ao Se, pode ser realizado em vários tecidos humanos, sendo feita neste trabalho através de três biomarcadores: as concentrações do mineral no plasma, eritrócitos e atividade da GPx1 eritrocitária. Vários pesquisadores têm avaliado a concentração de Se no plasma e observado redução da sua concentração em pacientes críticos,¹⁵ especialmente naqueles com choque séptico, sugerindo que a suplementação de Se poderia ser benéfica nesta população.^{27,76-78}

Sakr et al.⁷⁸, encontraram baixas concentrações de Se plasmático em 92% dos pacientes sépticos avaliados em UTI cirúrgica. Além disso, a concentração de Se no plasma diminuiu durante a internação, havendo associação das baixas concentrações com maior dano tecidual, infecção e aumento da mortalidade.

Deve-se ressaltar, entretanto, que não há valores de referência para o Se plasmático, podendo a determinação de deficiência variar de acordo com os valores propostos por cada autor.

Segundo Thomson⁵⁸, é difícil estabelecer uma faixa de referência para as concentrações de Se sanguíneo devido à variação do status do mineral em cada região geográfica, pois apresentam diferentes concentrações de Se no solo e conseqüentemente diferentes concentrações do mineral nos alimentos consumidos pelas diversas populações.

Além disso, outros fatores interferem com a interpretação da concentração do Se em pacientes críticos. Primeiro, a concentração de Se no plasma pode estar diminuída devido a resposta inflamatória sistêmica. Segundo, a concentração plasmática fornece uma soma de diferentes compostos contendo Se e embora exista uma ideia das proporções desses compostos em indivíduos saudáveis, não existem informações a respeito do paciente crítico. Terceiro, as concentrações de albumina estão reduzidas no paciente grave devido ao aumento

da permeabilidade capilar levando a perda de proteínas para o interstício, incluindo a GPx.⁸⁰

Stefanowicz et al. mostraram recentemente em população sem processo inflamatório, correlação positiva entre a concentração de Se no plasma e eritrócito. Essa mesma associação não foi encontrada em pacientes críticos com elevado processo inflamatório.⁴⁰ Além disso, nos pacientes críticos a concentração de Se no plasma estava reduzida e no eritrócito permaneceu dentro dos valores normais. Esses resultados sugerem que a medida da concentração de Se no eritrócito é melhor para avaliar o estado nutricional do selênio que a do plasma. Além disso, em comparação ao Se plasmático, a concentração do mineral nos eritrócitos responde mais lentamente à mudança no estado nutricional, devido à meia vida dos eritrócitos de 120 dias, sendo assim, a concentração do Se no eritrócito é considerada um biomarcador de médio prazo.⁸⁰ Nossos pacientes apresentaram concentração média de Se no plasma de $23,4 \pm 9,0$ µg/L e nos eritrócitos de $32,8 \pm 11,9$ µg/L. Estes valores estão abaixo dos valores de referência, indicando deficiência do mineral nos indivíduos com choque séptico. Além disso, em nosso estudo apenas a concentração de Se no eritrócito foi associada com a mortalidade na UTI e hospitalar, sendo o único trabalho até o momento a encontrar esse resultado.

Para investigar porque a concentração de Se eritrocitária foi associada à mortalidade em nossos pacientes, nós avaliamos também a atividade da GPx1 e seu polimorfismo Pro198Leu.

A GPx1 é uma das primeiras enzimas a ter sua atividade reduzida na deficiência de Se, como consequência, ela é também uma das primeiras selenoproteínas a responder ao aumento na ingestão de Se.²² Ainda não existe uma faixa de normalidade para a atividade da GPx eritrocitária, sendo até o momento utilizado os valores de referência indicado pelo fabricante dos kits.

De acordo com nossos resultados, 33% dos pacientes apresentaram valores abaixo da normalidade. Já em mulheres obesas²¹, 37% apresentaram reduzida atividade da GPx1 e em pacientes em hemodiálise²³, a atividade da enzima foi reduzida em apenas 11% dos avaliados. Estudos experimentais, também mostraram baixa atividade da GPx1 nos casos de deficiência de Se, sendo

sua atividade facilmente reestabelecida através da suplementação do micronutriente.^{45,46}

Em nosso estudo, não houve correlação estatisticamente significativa entre as concentrações de Se nos eritrócitos e os valores da atividade eritrocitária da GPx1 de acordo com os polimorfismos, resultado observado também em outros estudos.^{21,55} Entretanto, alguns trabalhos clínicos e experimentais mostraram resultados inversos.⁴⁸⁻⁵¹ Já em pacientes com síndrome da resposta inflamatória sistêmica, a atividade da GPx1 esteve relacionada tanto com a concentração de Se no plasma quanto nos eritrócitos, porém não foi avaliado o polimorfismo em questão.⁴⁰

Estudos avaliando o estado nutricional relativo ao Se e a relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx1 são escassos na literatura, não existindo até o momento nenhum dado para pacientes com choque séptico.

Alguns trabalhos^{81,82} avaliaram as frequências dos genótipos para diferentes populações em todo o mundo. Eles observaram que na população japonesa e polonesa a frequência do alelo variante Leu/Leu é praticamente zero; para suecos, americanos, ingleses e alemães a frequência é menor que 10%; para afro-americanos, canadenses e dinamarqueses a frequência já é um pouco maior que 10%, sendo a maior frequência do genótipo variante observada em turcos e finlandeses, cerca de 14%.

Em estudo brasileiro, a frequência do genótipo variante foi baixa tanto para descendentes de africanos quanto para indígenas, entretanto, na população residente no Distrito Federal, a frequência foi similar à observada na população americana e canadense.⁸²

No nosso trabalho, a frequência para o genótipo variante Leu/Leu foi de 7%, valor próximo ao encontrado para populações de suecos, americanos, ingleses e alemães. Além disso, o polimorfismo Pro198Leu não teve influência na concentração de Se eritrocitário, porém influenciou a atividade da GPx1. Os indivíduos portadores do alelo Leu apresentaram atividade eritrocitária da GPx1 maior do que os homozigotos para o alelo Pro, sendo estatisticamente significativa. Porém, nossos dados divergem dos resultados de alguns trabalhos,^{21,55} onde a presença do alelo variante Leu foi responsável pela

diminuição da atividade da enzima. Este dado talvez possa ser justificado pelo fato de que em homens há uma tendência no aumento da atividade da GPx1 na presença do alelo variante Leu.⁸³

Apesar do polimorfismo Pro198Leu e da atividade da GPx1 no nosso trabalho não terem explicado a influência da concentração do Se eritrocitário sob a mortalidade, não podemos descartar a possibilidade de que outros polimorfismos e de que outras enzimas possam exercer tal influência. Dados na literatura mostram uma diversidade de polimorfismos e enzimas antioxidantes relacionadas diretamente com a concentração de Se.⁸ Além disso, a associação da tiorredoxina redutase e da selenoproteína P com a concentração de Se no eritrócito ainda não foi avaliada em pacientes com choque séptico. Forceville et al. mostraram em pacientes com choque séptico e síndrome da resposta inflamatória sistêmica redução precoce da concentração plasmática de selenoproteína P, enquanto a atividade da GPx não se alterou. Esses resultados sugerem que a selenoproteína P pode ser um marcador precoce de injúria nos pacientes com choque séptico.⁸⁴

Outros estudos são necessários para avaliar a suplementação de selênio baseada nas concentrações séricas do Se no eritrócito. Além disso, a relação entre Se eritrocitário, tiorredoxina redutase e selenoproteína P necessita ser avaliada em pacientes críticos.

Conclusão

A baixa concentração de selênio eritrocitário está relacionada com o aumento da mortalidade na UTI e hospitalar em pacientes com choque séptico.

A atividade eritrocitária da GPx1 e o polimorfismo Pro198Leu do gene da GPx1 não explicam a associação do selênio eritrocitário com a mortalidade em pacientes com choque séptico.

Referências

1. 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; 41:580-637.
2. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001; 29:1303-10.
3. Silva E, Pedro MD, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care.* 2004; 8(4):R251-60.
4. Gerlach H, Keh D. Recent progress in sepsis epidemiology - have we learned enough? *Crit Care.* 2003; 7(5):333-4.
5. Andrews R, Elixhauser A. The national hospital bill: growth trends and 2005 update on the most expensive conditions by payer. Healthcare cost and utilization project. 2007 [2012 Novembro 21]. Available at: <http://www.hcup-us.ahrq.gov/reports/statbriefs/sb42.pdf>:1Y13.
6. Akamine N, Fernandes CJJ, Wey SB, Knobel E. Choque séptico. In: Knobel E. *Conduitas no paciente grave.* São Paulo: Atheneu; 1994. p.175-210.
7. Quenzer R, Allen S. Infections in the critically ill. In: Bongard FS, Sue DY. *Current critical care diagnosis & treatment.* Connecticut: Appleton & Lange; 1994. p.131-55.
8. Hanna N. Sepsis and septic shock. *Topics Emerg Med.* 2003; 25(2):158-65.
9. Balestra GM, Legrand M, Ince C. Microcirculation and mitochondria in sepsis: getting out of breath. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2009; 22(2):184-90.

10. Bakker J, Coffernils M, Leon M, Gris P, Vincent JL. Blood lactate levels are superior to oxygen-derived variables in predicting outcome in human septic shock. *Chest*. 1991; 99(4):956-62.
11. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*. 2002; 360(9328):219-23.
12. Hammerman C, Kaplan M. Ischemia and reperfusion injury. *Clin Perinatol*. 2000; 25(3):757-77.
13. Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, Conti M, Legrand A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2000; 3(5):373-84.
14. Manzanares W, Dhaliwal R, Jiang X, Murch L, Heyland DK. Antioxidant micronutrients in the critically ill: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2012; 16(2):R66.
15. Heyland DK, Dhaliwal R, Suchner U, Berger M. Antioxidant nutrients: a systematic review of vitamins and trace elements in the critically ill patient. *Int Care Med*. 2005; 31(3):327-37.
16. Finley JW. Bioavailability of selenium from foods. *Nutr Rev*. 2006; 64(3):146-51.
17. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet*. 2000; 356(9225):233-41.
18. Schrauzer GN. Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *J Nutr*. 2000; 130(7):1653-6.

19. Fox TE, Fairweather-Tait SJ. Selenium. In: Hurrell R. The mineral fortification of foods. Leatherhead: Leatherhead Publishing; 1999. v.2, p.1-44.
20. Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. Washington, DC: National Academy Press; 2000.
21. Cominetti C, Bortoli MC, Purgatto E, Ong TP, Moreno FS, Garrido AB, et al. Associations between glutathione peroxidase-1 Pro198Leu polymorphism, selenium status, and DNA damage levels in obese woman after consumption of Brazil nuts. *Nutrition*. 2011; 27(9):891-6.
22. Papp LV, Li J, Holmgren A, Khanna KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9(7):775-806.
23. Stockler-Pinto MB, Mafra D, Farage NE, Boaventura GT, Cozzolino SMF. Effect of Brazil nut supplementation on the blood levels of selenium and glutathione peroxidase in hemodialysis patients. *Nutrition*. 2010; 26: 1065-9.
24. Cardoso BR, Ong TP, Jacob-Filho W, Jaluul O, Freitas MID, Cozzolino SMF. Nutritional status of selenium in Alzheimer's disease patients. *Br J Nutr*. 2010; 103(6):803-6.
25. Story DA, Ronco C, Bellomo R. Trace element and vitamin concentrations and losses in critically ill patients treated with continuous venovenous hemofiltration. *Crit Care Med*. 1999; 27(1):220-3.
26. Angstwurm MWA, Gaertner R. Practicalities of selenium supplementation in critically ill patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2006; 9(3):233-8.

27. Forceville X, Vitoux D, Gauzit R, Combes A, Lahilaire P, Chappuis P. Selenium, systemic immune response syndrome, sepsis, and outcome in critically ill patients. *Crit Care Med.* 1998; 26(9):1536-44.
28. Manzanares W, Biestro A, Galusso F, Torre MH, Mañay N, Pittini G, et al. Serum selenium and glutathione peroxidase-3 activity: biomarkers of systemic inflammation in the critically ill? *Intensive Care Med.* 2009; 35(5):882-9.
29. Angstwurm MW, Schottdorf J, Schopohl J. Selenium replacement in patients with severe systemic inflammatory syndrome improves clinical outcome. *Crit Care Med.* 1999; 27(9):1807-13.
30. Misha V, Baines M, Perry S. Selenium supplementation and outcome in septic ICU patients. *Clin Chim Acta.* 2005; 355:S45-6.
31. Geoghegan M, McAuley D, Eaton S, Powell-Tuck J. Selenium in critical illness. *Curr Opin Crit Care.* 2006; 12(2):136-41.
32. Berger MM, Spertini F, Shenkin A, Wardle C, Wiesner L, Schindler C, et al. Trace element supplementation modulates pulmonary infection rates after major burns: a double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68(2):365-71.
33. Berger MM, Recmond MJ, Shenkin A, Rey F, Wardle C, Cayeux C, et al. Influence of selenium supplements on the post-traumatic alterations of the thyroid axis: a placebo-controlled trial. *Intensive Care Med.* 2001; 27(1):91-100.
34. Berger MM, Soguel L, Shenkin A, Revelly JP, Pinget C, Baines M, et al. Influence of early antioxidant supplements on clinical evolution and organ

- function in critically ill cardiac surgery, major trauma, and subarachnoid hemorrhage patients. *Crit Care*. 2008; 12(4):R101.
35. Heyland DK, Dhaliwal R, Day AG, Muscedere J, Drover J, Suchner U, et al. Reducing Deaths due to Oxidative Stress (The REDOXS Study): rationale and study design for a randomized trial of glutamine and antioxidant supplementation in critically-ill patients. *Proc Nutr Soc*. 2006; 65(3):250-63.
 36. Gromadzinska J, Reszka E, Bruzelius K, Wasowicz W, Akesson B. Selenium and cancer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium supplements. *Eur J Nutr*. 2008; 47 Suppl 2:29-50.
 37. Thomson CD. Selenium and iodine intakes and status in New Zealand and Australia. *Br J Nutr*. 2004; 91(5):661-72.
 38. Duncan A, Talwar D, McMillan DC, Stefanowicz F, O'Reilly DS. Quantitative data on the magnitude of the systemic inflammatory response and its effect on micronutrient status based on plasma measurements. *Am J Clin Nutr*. 2012; 95(1):64-71.
 39. Nichol C, Herdman J, Sattar N, O'Dwyer PJ, St J O'Reilly D, Littlejohn D, et al. Changes in the concentration of plasma selenium and selenoproteins after minor elective surgery: further evidence for the negative acute phase response. *Clin Chem*. 1998; 44(8 Pt 1):1764-66.
 40. Stefanowicz FA, Talwar D, O'Reilly DSJ, Dickinson N, Atkinson J, Hursthouse AS, et al. Erythrocyte selenium concentration as a marker of selenium status. *Clin Nutr*. 2013; 32(5):837-42.
 41. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The antioxidant role of selenium and selenocompounds. *Bromed Pharmacother*. 2003; 57(3-4):134-44.

42. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase familydan evolution overview. *FEBS J.* 2008; 275(15):3959-70.
43. Hesketh J. Nutrigenomics and selenium: gene expression patterns, physiological targets, and genetics. *Annu Rev Nutr.* 2008; 28:157-77.
44. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov, Lobanov AV, Zehtab O, Guigó R, et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science.* 2003; 300(5624):1439-43.
45. Lei XG, Cheng WH, McClung JP. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Annu Rev Nutr.* 2007; 27:41-61.
46. Baker RD, Baker SS, Larosa K, Whitney C, Newburger PE. Selenium regulation of glutathione peroxidase in human hepatoma cell line Hep3B. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 304(1):53-7.
47. Ratnasinghe D, Tangrea JA, Andersen MR, Barrett MJ, Virtamo J, Taylor PR, et al. Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Res.* 2000; 60(22):6381-3.
48. Hu YJ, Diamond AM. Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. *Cancer Res.* 2003; 63(12):3347-51.
49. Hamanishi T, Furuta H, Kato H, Doi A, Tamai M, Shimomura H, et al. Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are associated with increased intima-media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 2004; 53(9):2455-60.

50. Lei C, Niu X, Wei J, Zhu J, Zhu Y. Interaction of glutathione peroxidase-1 and selenium in endemic dilated cardiomyopathy. *Clin Chim Acta*. 2009; 399(1-2):102-8.
51. Raaschou-Nielsen O, Sorensen M, Hansen RD, Frederiksen K, Tjønneland A, Overvad K, et al. GPX1 Pro198Leu polymorphism, interactions with smoking and alcohol consumption, and risk for lung cancer. *Cancer Lett*. 2007; 247(2):293-300.
52. Zhao H, Liang D, Grossman HB, Wu X. Glutathione peroxidase 1 gene polymorphism and risk of recurrence in patients with superficial bladder cancer. *Urology*. 2005; 66(4):769-74.
53. Arsova-Sarafinovska Z, Matevska N, Eken A, Petrovski D, Banev S, Dzikova S, et al. Glutathione peroxidase 1 (GPX1) genetic polymorphism, erythrocyte GPX activity, and prostate cancer risk. *Int Urol Nephrol*. 2008; 41(1):63-70.
54. Jablonska E, Gromadzinska J, Reszka E, Wasowicz W, Sobala W, Szeszenia-Dabrowska N, et al. Association between GPx1 Pro198Leu polymorphism, GPx1 activity and plasma selenium concentration in humans. *Eur J Clin Nutr*. 2009; 48(6):383-6.
55. 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.
56. Gonzaga IB. Avaliação nutricional relativa ao selênio em crianças com dieta enriquecida de castanha do Brasil [tese]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2002.

57. Thomson CD. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *Eur J Clin Nutr.* 2004; 58(3):391-402.
58. Ortuño J, Ros G, Periago MJ, Martinez C, Lopez G, Rodrigo J. Importancia nutricional del selênio. *Arch Latinoam Nutr.* 1997; 47(1):6-13.
59. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70(1):158-69.
60. Ishida K, Morino T, Takagi K, Sukenaga Y. Nucleotide sequence of a human gene for glutathione peroxidase. *Nucleic Acids Res.* 1987; 15(23):10051.
61. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994; 233:357-63.
62. Linde-Zwirble WT, Angus DC. Severe sepsis epidemiology: Sampling, selection, and society. *Crit Care.* 2004; 8(4):222-6.
63. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med.* 2007; 35(5):1244-50.
64. Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Webster NR. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med.* 1995; 23(4):646-51.
65. Metnitz PG, Bartens C, Fischer M, Fridrich P, Steltzer H, Druml W. Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* 1999; 25:180-5.

66. Cowley HC, Bacon PJ, Goode HF, Webster NR, Jones JG, Menon DK. Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors. *Crit Care Med.* 1996; 24(7):1179-83.
67. Huet O, Obata R, Aubron C, Spraul-Davit A, Charpentier J, Laplace C, et al. Plasma-induced endothelial oxidative stress is related to the severity of septic shock. *Crit Care Med.* 2007; 35(3):821-6.
68. Cighetti G, Paroni R, Marzorati S, Borotto E, Giudici R, Magnanini, et al. Evaluation of oxidative stress in serum of critically ill patients by a commercial assay and gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chem.* 2005; 51(8):1515-7.
69. Abiles J, De La Cruz AP, Castaño J, Rodríguez-Elvira M, Aguayo E, Moreno-Torres R, et al. Oxidative stress is increased in critically ill patients according to antioxidant vitamins intake, independent of severity: a cohort study. *Crit Care.* 2006; 10(5):R146.
70. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova.* 2007; 30:1323-38.
71. Forceville X. Effects of high doses of selenium, as sodium selenite, in septic shock patients a placebo-controlled, randomized, double-blind, multi-center phase II study--selenium and sepsis. *J Trace Elem Med Biol.* 2007; 21:62-5.
72. Avenell A, Noble DW, Barr J, Engelhardt T. Selenium supplementation for critically ill adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004; (4): CD00370 3.

73. Spallholz JE. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radic Biol Med.* 1994; 17(1):45-64.
74. Heyland DK, Manzanares W. Pharmaconutrition with antioxidant micronutrients in the critically ill: the time has come! *Nutrition.* 2013; 29(1):359-60.
75. Harrison I, Littlejohn D, Fell GS. Distribution of selenium in human blood plasma and serum. *Analyst.* 1996; 121(2):189-94.
76. Heyland DK. Selenium supplementation in critically ill patients: can too much of a good thing be a bad thing? *Crit Care.* 2007; 11(4):153.
77. Hawker FH, Stewart PM, Snitch PJ. Effects of acute illness on selenium homeostasis. *Crit Care Med.* 1990; 18(4):442-6.
78. Sakr Y, Reinhart K, Bloos F, Marx G, Russwurm S, Bauer M, et al. Time course and relationship between plasma selenium concentrations, systemic inflammatory response, sepsis, and multiorgan failure. *Br J Anaesth.* 2007; 98(6):775-84.
79. Haji-Michael PG, Vincent JL. The importance of being selenium. *Crit Care Med.* 1998; 26(9):1478-9.
80. Van Dael P, Deelstra H. Selenium. *Int J Vitam Nutr Res.* 1993; 63(4):312-6.
81. Iida R, Tsubota E, Yuasa I, Takeshita H, Yasuda T. Simultaneous genotyping of 11 non-synonymous SNPs in the 4 glutathione peroxidase genes using the multiplex single base extension method. *Clin Chim Acta.* 2009; 402(1-2):79-82.
82. De Oliveira CH, Miranda-Vilela AL, Rocha DM, de Oliveira SF, Hatagima A, de Nazaré Klautau-Guimarães M. Superoxide dismutase, catalase, glutathione

peroxidase and glutathione S-transferases M1 and T1 gene polymorphisms in three Brazilian population groups. *Genet Mol Biol.* 2011; 34(1):11-8.

83. Donadio JLS. Polimorfismos nos genes da glutatuiiona peroxidase e biomarcadores do estado nutricional relativo ao selênio em população adulta de São Paulo [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2002.
84. Forceville X, Mostert V, Pierantoni A, Vitoux D, Le Toumelin P, Plouvier E, et al. Selenoprotein P, rather than glutathione peroxidase, as a potential marker of septic shock and related syndromes. *Eur Surg Res.* 2009; 43(4):338-47.