



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS  
QUE DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA  
E DO PERFIL OXIDATIVO EM RATOS COM  
SEPSE INDUZIDA**

**TESE DE DOUTORADO**

**Claudia de Mello Bertoncheli dos Santos**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE  
DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA E DO PERFIL  
OXIDATIVO EM RATOS COM SEPSE INDUZIDA**

**Claudia de Mello Bertoncheli dos Santos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),  
como requisito parcial para obtenção do grau de:  
**Doutora em Ciências Farmacêuticas**

**Orientadora: Daniela Bitencourt Rosa Leal**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

de Mello Bertoncheli dos Santos, Claudia  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE DEGRADAM  
NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA E DO PERFIL OXIDATIVO EM RATOS  
COM SEPSE INDUZIDA / Claudia de Mello Bertoncheli dos  
Santos.-2014.  
86 p.; 30cm

Orientadora: Daniela Bitencourt Rosa Leal  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2014

1. Sepsis 2. E-NTPDase 3. Estresse oxidativo 4.  
Perfuração e ligação do ceco - CLP I. Bitencourt Rosa  
Leal, Daniela II. Título.

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da  
Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

---

©2014

Todos os direitos autorais reservados a Claudia de Mello Bertoncheli dos Santos. A  
reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a  
citação da fonte.

Endereço: Avenida Roraima, n.1000, Prédio 20, sala 4102, Bairro Camobi, Santa  
Maria, RS. CEP: 97105-900. Fone: (055)3220-9581. E-mail:  
claudiabertoncheli@gmail.com.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE DEGRADAM  
NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA E DO PERFIL OXIDATIVO EM RATOS  
COM SEPSE INDUZIDA**

elaborada por  
**Claudia de Mello Bertoncheli dos Santos**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutora em Ciências Farmacêuticas**

**Comissão Examinadora:**

---

**Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dr<sup>a</sup>.** (Presidente/Orientadora)

---

**Jeandre Augusto dos Santos Jaques, Dr.** (UFMS)

---

**Margarete Dulce Bagatini, Dr<sup>a</sup>.** (UFFS)

---

**Rosmari Hörner, Dr<sup>a</sup>.** (UFMS)

---

**Sônia Terezinha dos Anjos Lopes, Dr<sup>a</sup>.** (UFMS)

**Santa Maria, 30 de julho de 2014.**

*Dedico esse trabalho ao meu bem  
mais precioso: minha filha Helena!!!*

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de lutar pelos meus objetivos a cada dia concedido.

Aos meus pais, Dario e Ilza (*in memoriam*), pelo apoio, incentivo. Muito obrigada por acreditarem em meus sonhos independente do tamanho deles.

À minha irmã Danise pelo apoio e companheirismo nas horas difíceis e de descontração. Ao meu sobrinho amado, meu filho mais velho Angelo Elessar, pela presença constante em minha vida. Serás sempre o meu garotinho. Elessar! A tia te ama muito.

Ao meu marido, Rafael, pelo incentivo, companheirismo, amor, paciência e compreensão em todos os momentos de ausência e renúncia para que este trabalho pudesse ser realizado. Obrigada por me aguentar todos os dias, coisa que não é muito fácil rsrsrs. Mas acima de tudo obrigada pelo meu maior presente nossa filha Helena. Sem você com certeza não teria realizado o meu sonho de ser mãe. Mor! Te amo muito!

À minha florzinha, meu tesourinho, meu docinho, minha jóia rara, minha riqueza... meu bebezinho... minha filha HELENA... como te desejei... te esperei... hoje me sinto completa com tua presença. Não há palavras que descrevam o meu amor por você. Meu peito transborda de felicidade ao te ouvir me chamar de mãe. Muito obrigada por ter me escolhido como mãe. Obrigada por tornar meus dias muito mais cor de rosa. Obrigada por dar um novo sentido a minha vida. AMO VOCÊ.

À minha orientadora e amiga Daniela, que não poupou esforços para que eu chegasse até aqui. Dani, obrigada pelos ensinamentos desde a época que eu era bolsista do LAC-HUSM. Obrigada por me mostrar o universo da pesquisa, um mundo que até então eu não conhecia e hoje sou completamente apaixonada. Mas principalmente MUITO OBRIGADA por me trazer de volta a vida em um momento em que estava desistindo de tudo, fazendo com que eu tomasse um novo rumo preenchendo os meus dias. Obrigada pelo exemplo de força. Te admiro muito pela pessoa e profissional que és.

Ao Ailton Pinto, meu colega de trabalho na imuno-histoquímica, mas acima de tudo meu amigo. Obrigada por me apoiar durante a execução desse trabalho e por me ouvir horas e horas.

A Nara Beck, chefe do Laboratório de Patologia do HUSM, pelo apoio e pela disponibilidade para a realização de uma parte desse trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório 4229 Livia, Karine, João, Jader, Maria Luiza, Renata, Viviane e Jeandre. Obrigada por todos os ensinamentos, pelas risadas, mas principalmente muito obrigada por todos os esforços para o desenvolvimento desse trabalho. Aos meus queridos ICs Pedro, Fernanda, Leonardo e Marina por todo o auxílio. A Daniela Passos pela ajuda na revisão desse trabalho.

Em especial agradeço à Livia e ao Pedro que ficaram comigo até as 4h da madrugada para a realização da 3ª etapa desse experimento, bem como a Karine e a Fernanda que também ficaram até altas horas. MUITO OBRIGADA.

Ao Daniel Roulin pela disponibilidade e atenção para indução da sepse e pelo excelente trabalho realizado. Muito obrigada.

A minha amiga Jamile. Minha companheira nas longas madrugadas de estudo e de projetos. É não é fácil ser mãe, pesquisadora, esposa e mulher, mas conseguimos tirar isso de letra. Como? Nem nós sabemos. Obrigada por todos os ensinamentos, pelos momentos de descontração e até mesmo os momentos de tensão para a submissão de projetos. Mile!!! Estou muito feliz com a tua conquista, no entanto, muito triste com a tua partida.

Aos amigos e pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

*“Saudade é não saber. Não saber o que fazer com os dias que ficaram mais compridos, não saber como encontrar tarefas que lhe cessem o pensamento, não saber como frear as lágrimas diante de uma música, não saber como vencer a dor de um silêncio que nada preenche.”*

*Martha Medeiros*



## **RESUMO**

Tese de doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA E DO PERFIL OXIDATIVO EM RATOS COM SEPSE INDUZIDA**

AUTORA: CLAUDIA DE MELLO BERTONCHELI DOS SANTOS

ORIENTADORA: DANIELA BITENCOURT ROSA LEAL

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 30 de Julho de 2014.

A sepse pode ser definida como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) decorrente da reação do sistema imunológico à infecção, denotando um processo progressivo de dano tecidual, onde a disfunção múltipla dos órgãos é a expressão mais grave. O sistema de sinalização purinérgica desempenha um papel importante na modulação das respostas inflamatórias e imunes através de biomoléculas extracelulares, como os nucleotídeos de adenina e seu derivado nucleosídeo adenosina. Essas moléculas sinalizadoras são liberadas do meio intracelular em resposta ao dano ou ao estímulo celular por ação de patógenos. Os efeitos dos nucleotídeos de adenina e da adenosina são promovidos através da ativação de receptores purinérgicos específicos e controlados por uma cascata enzimática localizada na superfície das células. Além das alterações imunes, o estresse oxidativo desempenha um importante papel na patofisiologia desta doença, contribuindo para os principais efeitos sistêmicos deletérios da sepse como a hipóxia tecidual e a falência de órgãos. Sendo assim, visando à melhor compreensão desta patologia, este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade da enzima E-NTPDase em linfócitos bem como analisar o perfil oxidativo em cérebro, coração, fígado e rins em ratos submetidos à sepse experimental utilizando a técnica de ligação e perfuração do ceco (CLP). Os procedimentos para avaliação dos efeitos da sepse sob a atividade das enzimas E-NTPDase em linfócitos e sob os parâmetros de estresse oxidativo nos tecidos foram divididos em duas etapas. Na primeira etapa, os animais foram divididos em dois grupos: (1) controle negativo e (2) séptico, onde se avaliou a atividade da E-NTPDase e

a análise histológica dos rins, fígado e pulmão. Para a segunda etapa, os animais foram divididos em 3 grupos: (1) controle negativo, (2) Sham e (3) séptico, na qual se determinou os parâmetros de estresse oxidativo, bem como o perfil bacteriano e hematológico. Observou-se um aumento na hidrólise de ATP em ratos com sepse induzida quando comparado ao grupo controle. Contudo, a atividade da E-NTPDase não foi alterada, quando utilizado ADP como substrato. Pelas análises histológicas de rins, fígado e pulmão verificou-se no grupo séptico a presença de congestão vascular, necrose e infiltrado inflamatório mononuclear quando comparados com o grupo controle. Em relação à atividade antioxidante não se observou diferença significativa no conteúdo de NPSH e na atividade da SOD em nenhum órgão analisado. Quanto aos parâmetros do estresse oxidativo, o teor de proteína carbonil não apresentou diferença significativa no cérebro e no fígado enquanto nos tecidos cardíaco e renal observou-se um decréscimo no grupo séptico em relação aos demais grupos. Não foi observada nenhuma diferença significativa nos níveis de TBARS no cérebro, no entanto, estes níveis estavam reduzidos no coração e no fígado e aumentados no tecido renal. Foi identificado como agente etiológico da sepse *E. coli*. Observou-se significativas alterações hematológicas no grupo séptico como: leucocitose e trombocitopenia. Com o presente trabalho conclui-se que, na sepse induzida, o aumento da hidrólise do ATP seja provavelmente consequência de uma resposta dinâmica para reduzir os níveis elevados de ATP resultantes da morte celular. Já a redução nos parâmetros de estresse oxidativo no coração e no fígado pode ter ocorrido devido a diferenças na indução da sepse pelo modelo CLP entre os diferentes grupos de pesquisa, adicionado à função dos neutrófilos alterados e também às características inerentes do tipo de micro-organismo patogênico.

Palavras-chave: Sepse; NTPDase; Estresse Oxidativo; Perfuração e ligação do ceco - CLP.

## **ABSTRACT**

Thesis of Doctor's Degree  
Post-Graduating Program in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria

### **EVALUATION ACTIVITY ENZYMES THAT DEGRADE ADENINE NUCLEOTIDES AND OXIDATIVE PROFILE IN RATS WITH INDUCED SEPSIS**

AUTHOR: CLAUDIA DE MELLO BERTONCHELI DOS SANTOS

ADVISOR: DANIELA BITENCOURT ROSA LEAL

Place and Date: Santa Maria, July 30<sup>th</sup>, 2014.

Sepsis is recognized as a systemic inflammatory response (SIRS) to infection with the presence of progressive tissue damage, where multiple organ failure is the most severe expression. The purinergic signaling plays an important role in inflammatory response modulation as well as in immune responses through its extracellular biomolecules, such as adenine nucleotides and its derivative nucleoside adenosine. These signalling molecules are released by cells in response to damage or cellular stimuli induced by pathogens. Adenine nucleotides and adenosine effects are promoted by activation of specific purinergic receptors controlled by an enzymatic cascade on cell surface. In addition to immunologic changes, oxidative stress has an important part in sepsis pathophysiology, contributing to its deleterious systemic effects such as tissue hypoxia and organ failure. This study aims to evaluate the activity of the E-NTPDase, which degrade adenine nucleotides in lymphocytes, as well as analyse the oxidative profile in brain, heart, liver and kidney in rats submitted to experimental sepsis. The sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP). The evaluation of the effects of sepsis on E-NTPDase activity in lymphocytes, as well as on the oxidative stress parameters in different tissues, was divided into two stages. On the first stage, the animals were split into two groups: (1) negative controls and (2) septic, which evaluated the activity of the E-NTPDase and histological analysis of the kidneys, liver and lung. On the second stage, the animals were divided into three groups: (1) negative controls, (2) sham e (3) septic. An increase in ATP hydrolysis was observed in sepsis-induced rats when compared to the control group. Nevertheless, the E-NTPDase activity remained unchanged when ADP was applied as substrate. Histological analyses of kidneys, liver

and lung have shown vascular congestion, necrosis and inflammatory mononuclear cell infiltration when compared to control group. Regarding the antioxidant activity, no difference was observed in the NPSH content and SOD activity in the organs analysed. Concerning the oxidative stress parameters, the carbonyl protein content showed no significant difference in brain and liver, whilst in heart and kidney a decrease was observed in the septic group. No significant difference in TBARS levels was observed in brain, however an increase was observed in kidney while a decrease was observed in heart and liver. *E. coli* was identified as the etiological agent. On the septic group, significant hematological changes such as leucocytosis and thrombocytopenia were observed. This reduction in TBARS levels in heart and liver does not agree with data on the literature; this may be due to the employment of different induction techniques among studies, added to altered neutrophil function and also the characteristics inherent to the pathogenic microorganism. Our findings suggest that the increase in ATP hydrolysis in induced sepsis may be a dynamic response in order to eliminate the increased ATP levels resulting from cell death. Regarding the oxidative stress parameters, the reduction in heart and liver may be due differences in the sepsis induction of CLP model by between different research groups added to altered neutrophil function and also the characteristics inherent to the pathogenic microorganism.

Keywords: Sepsis, NTPDase, Oxidative stress, Cecal ligation and puncture (CLP)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

Figura 1 - Definições de sepse e síndromes relacionadas .....	20
Figura 2 - Procedimento para indução da sepse pelo modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP) .....	25
Figura 3 - Representação dos componentes do sistema purinérgico .....	28
Figura 4 - Liberação extracelular de ATP e ADP e ativação dos receptores de ATP (P2) durante a inflamação .....	29
Figura 5 - Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeo da adenina .....	32

### MANUSCRITO

Figure 1 - Non-protein sulfhydryl group levels in brain (A), heart (B), kidney (C) and liver (D) from rats with induced sepsis .....	54
Figure 2 - Superoxide dismutase (SOD) activity in brain (A), heart (B), kidney (C) and liver (D) from rats with induced sepsis .....	55
Figure 3 - Carbonil levels in brain (A), heart (B), kidney (C) and liver (D) from rats with induced sepsis .....	56
Figure 4 - Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels in brain (A), heart (B), kidney (C) and liver (D) from rats with induced sepsis .....	57

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO

Table 1 - Hematological parameters of rats with induced sepsis .....	53
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ADA** - Adenosina desaminase  
**ADP** - Adenosina difosfato  
**AM** - Adenosina monofosfato  
**ATP** - Adenosina trifosfato  
**CASP**- Modelo de introdução de cateter no cólon ascendente (*Colon Ascendens Stent Peritonitis*)  
**CAT**- Catalase  
**CLD**- Modelo de ligação e dissecação do ceco (*Cecum Ligation and Dissection*)  
**CLI**- Modelo de ligação e incisão do ceco (*Cecal Ligation and Incision*)  
**CLP**- Modelo de ligação e perfuração do ceco (*Cecal Ligation and Puncture*)  
**DAMPS**- Padrões moleculares associados ao dano (*Damage-Associated Molecular Patterns*)  
**DNA**- Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)  
**DTNB**- Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico  
**E-ADA**: Ecto- adenosina deaminase  
**E-NTPDase**: Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase  
**E-NPP**: Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase  
**E-5'-NT**: Ecto-5'-nucleotidase  
**ERO**- Espécies reativas de oxigênio  
**FOM**- Falência orgânica múltipla  
**GPx**- Glutaciona peroxidase  
**GSH**- Glutaciona reduzida  
**IL-1 $\beta$** - Interleucina-1 beta  
**IL-2**- Interleucina-2  
**IL-6**- Interleucina-6  
**IL-12**- Interleucina-12  
**INF- $\gamma$** - Interferon gama  
**LPS**- Lipopolissacarídeo  
**MDA**- Malondialdeído  
**NETs**- Armadilhas extracelulares neutrofilicas (*Neutrophils Extracellular Traps*)  
**NPSH**- Grupamentos tióis não-protéicos (*Net Positive Suction Head*)  
**PAF**- Fator de agregação plaquetária (*Platelet-Activating Factor*)  
**PaCO<sub>2</sub>**- Pressão parcial de CO<sub>2</sub>  
**PCR**- Proteína C reativa  
**PAMPs**- Padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*)  
**PMN**- Polimorfonucleares  
**SDMOS**- Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos  
**SIRS**- Síndrome da resposta inflamatória sistêmica  
**SOD**- Superóxido dismutase  
**SOFA**- *Sequential Organ Failure Assessment*  
**SVO<sub>2</sub>**- Saturação venosa mista de oxigênio

**TBARS-** Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric acid reactive substances*)

**TLR-** Receptor de membrana Toll-like (*Toll-Like Receptor*)

**TNF- $\alpha$** - Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$* )

**UTI-** Unidade de terapia intensiva



## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo A - Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética em uso animal .....</b>	<b>81</b>
<b>Anexo B - Artigo publicado no periódico <i>The Scientific World Journal</i> .....</b>	<b>82</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
2.1 Objetivo geral .....	36
2.2 Objetivos específicos .....	36
<b>3 ARTIGO - INCREASED NTPDASE ACTIVITY IN LYMPHOCYTES DURING EXPERIMENTAL SEPSIS .....</b>	<b>37</b>
<b>4 MANUSCRITO - EVALUATION OF THE OXIDATIVE PROFILE IN RATS SUBMITTED TO SEPSIS .....</b>	<b>38</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>7 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>68</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>69</b>

## **APRESENTAÇÃO**

Esta tese está organizada na seguinte forma:

- Primeiramente são apresentados a Introdução e os Objetivos.
- Os Resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de um artigo e um manuscrito compostos pelos itens Materiais e Métodos, Resultados e Discussão e Referências Bibliográficas. O artigo e o manuscrito estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas: The Scientific World Journal (Artigo) e Redox Report (Manuscrito)
- Os itens Discussão e Conclusão contêm interpretações e comentários gerais referentes aos manuscritos.
- As Referências Bibliográficas apresentadas no final da tese referem-se às citações que aparecem nos itens Introdução e Discussão.

# 1 INTRODUÇÃO

O progresso tecnológico na área médica dos últimos anos permitiu uma melhor compreensão de várias patologias e suas consequências. Essa evolução forneceu técnicas diagnósticas mais acuradas e novas alternativas terapêuticas que possibilitam conter os efeitos deletérios o mais cedo possível. Nesse contexto, o entendimento da fisiopatologia da sepse obteve alguns avanços, no entanto, esta continua sendo uma doença não totalmente compreendida (RITTIRSCH et al., 2008).

A sepse pode ser definida como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) decorrente da reação do sistema imunológico após um insulto infeccioso, denotando um processo progressivo de dano tecidual onde a disfunção múltipla dos órgãos é a expressão mais grave (VINCENT et al., 2013). Apesar da extensa pesquisa, sua patofisiologia é ainda pouco compreendida, e sua incidência continua alta, devido, principalmente, ao crescente número de pacientes cronicamente doentes, o uso frequente de procedimentos invasivos, a crescente resistência dos micro-organismos e ao aumento da expectativa de vida da população, a qual possui a imunidade comprometida, como resultado da imunossenescência (NEMZEK et al., 2008; TYML, 2011).

As manifestações clínicas da sepse são conhecidas desde a época de Hipócrates (460-377a.c.) quando este introduziu o termo “ferida em putrefação”. Entretanto, somente no século XX, com o reconhecimento da teoria dos germes, a sepse foi denominada como uma infecção sistêmica a qual resulta da invasão do hospedeiro pelo patógeno que se dissemina pela corrente circulatória (ANGUS; POLL, 2013; FUNK et al, 2009). Com base nesse conhecimento, vários estudos foram realizados sobre a resposta imune do hospedeiro contra o agente infeccioso, o que gerou uma grande quantidade de sinônimos, como sepse, síndrome séptica e choque séptico. Infelizmente, esses termos eram utilizados para designar a mesma condição clínica dificultando, assim, a uniformização de condutas clínicas e a comparação entre os estudos (RANGEL-FRAUSTO, 2005).

Em 1992, a ACCP/SCCM (*American College of Chest Physicians e Society of Critical Care Medicine*) realizou uma conferência para padronizar as definições de

sepse e síndromes relacionadas (RANGEL-FRAUSTO, 2005). A uniformização de definições e nomenclaturas permitiu que fenômenos fisiopatológicos e intervenções terapêuticas passassem a ser avaliados de forma consistente e uniforme. Nesse consenso foi introduzido o termo síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) o qual designa uma resposta clínica decorrente de um insulto não específico (BONE et al., 1992). Em 2001, uma nova conferência de consenso foi realizada onde foram revalidadas as terminologias sugeridas pelo consenso de 1992 e foram incluídos outros critérios para o diagnóstico da sepse (Figura 1) (LEVY et al., 2003).

			<b>HIPOTENSÃO</b> (PAM<90)
		<b>DISFUNÇÃO DE ÓRGÃOS</b>	<b>DISFUNÇÃO DE ÓRGÃOS</b>
	<b>FOCO INFECCIOSO</b> – respiratório – abdominal – cutâneo – renal – SNC – culturas	<b>FOCO INFECCIOSO</b>	<b>FOCO INFECCIOSO</b>
<b>SIRS (2 de 4)</b> – temperatura <36°C ou >38°C – FC >90 – FR >20 ou PaCO <sub>2</sub> <32 – leucócitos: >12000, <4000 ou mais de 10% de bastonados	<b>SIRS</b>	<b>SIRS</b>	<b>SIRS</b>
<b>SIRS</b>	<b>SEPSE</b>	<b>SEPSE GRAVE</b>	<b>CHOQUE SÉPTICO</b>

Figura 1 - Definições de sepse e síndromes relacionadas. SIRS: Síndrome da resposta inflamatória sistêmica, FC: Frequência cardíaca, FR: Frequência respiratória, SNC: Sistema nervoso central, PAM: Pressão arterial média. (HENKIN et al, 2009)

A SIRS foi descrita como a resposta contra agentes infecciosos ou não e está diretamente relacionada à resposta imune do hospedeiro ocorrendo em uma grande variedade de condições clínicas severas, como: infecção, trauma, queimaduras, rbdomiólise, pancreatite e pós-operatório de cirurgia cardíaca (BONE et al., 1992; HOESEL; WARD, 2004; RANGEL-FRAUSTO, 2005). Define-se um quadro de SIRS quando o paciente manifesta duas ou mais das seguintes condições: 1) temperatura  $>38^{\circ}\text{C}$  ou  $< 36^{\circ}\text{C}$ ; 2) frequência cardíaca  $> 90$  bpm; 3) frequência respiratória  $> 20$  ipm ou  $\text{PCO}_2 < 32$  mmHg); 4) contagem de glóbulos brancos  $>12.000/\text{mm}^3$  ou  $< 4.000/\text{mm}^3$  ou mais de 10% de formas imaturas (BONE et al., 1992).

A sepse é caracterizada pela presença de dois critérios de SIRS associada com um foco infeccioso (BONE et al., 1992). Em 2001, outros critérios foram incorporados para o diagnóstico da sepse: 1) edema; 2) hiperglicemia na ausência de diabetes; 3) variáveis inflamatórias: aumento das concentrações da proteína C reativa (PCR) ou procalcitonina; 4) saturação venosa mista de oxigênio ( $\text{SVO}_2$ ) e 5) índice cardíaco (LEVY et al., 2003). As causas mais frequentes de sepse são as infecções causadas por bactérias embora fungos, helmintos e vírus possam também causar sepse (VAN DER POLL; OPAL, 2008). Estes patógenos desencadeiam uma cascata inflamatória com produção excessiva de mediadores inflamatórios e intensa ativação de células inflamatórias, como neutrófilos, resultando em um desequilíbrio metabólico. Os sítios de infecções mais comuns são os pulmões, o abdômen e o trato urinário (HOESEL; WARD, 2004). Quando a sepse está associada à disfunção de órgãos, à hipoperfusão tecidual ou à hipotensão arterial, é caracterizada como sepse grave, a qual pode incluir oligúria aguda, hiperbilirrubinemia, aumento das concentrações de uréia e creatinina, alteração na perfusão tecidual e trombocitopenia além de outras anormalidades de coagulação (BONE et al., 1997). A sepse grave ocorre devido a uma ampla variedade de infecções como: pneumonia, peritonite, infecção de partes moles, meningite e doenças virais (RABELLO et al., 2009).

O choque séptico é caracterizado pela presença de hipotensão induzida pela sepse ou a persistência de alterações da perfusão tecidual após a ressuscitação hemodinâmica adequada, alteração do estado mental e taquipnéia podendo estar

associado à síndrome da insuficiência respiratória aguda, à coagulação intravascular disseminada e à falência renal aguda (BONE et al., 1991; COHEN, 2009).

A síndrome da disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (SDMOS) ou falência orgânica múltipla (FOM) caracteriza-se pela presença de função orgânica alterada em dois ou mais órgãos em pacientes agudamente enfermos, o que demanda a instituição de intervenções específicas para a manutenção da hemostasia (LEVY et al., 2003). Para a avaliação da disfunção de órgãos utiliza-se o escore *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA), onde quanto maior o escore maior a probabilidade de morte (GUPTA; JONAS, 2006).

No intuito de estadiar os pacientes sépticos, foi proposto o sistema PIRO – onde P = Predisposição (condição predisponente), I = Infecção (natureza e extensão do insulto), R = Resposta do organismo (natureza e magnitude da resposta do paciente) e O = disfunção Orgânica (grau de disfunção orgânica). Este sistema foi proposto para caracterizar e estadiar a resposta do paciente séptico à infecção, sugerindo áreas onde avanços científicos e tecnológicos podem ser alcançados, como na pesquisa básica sobre marcadores da competência imunológica e biomarcadores envolvidos no reconhecimento da sepse e suas implícitas e potenciais disfunções orgânicas (LEVY et al., 2003).

Apesar dos grandes avanços da medicina intensiva, a sepse é a causa mais comum de admissão em UTI no mundo (DREIHER et al., 2012). A incidência e o número de mortes relacionadas à sepse nos Estados Unidos foram estimados em 751.000 e 215.000 casos por ano, respectivamente (ANGUS et al., 2001; MARTIN et al., 2003). Na Europa, o quadro da sepse é similar (ALBERTI et al., 2002; ANNANE et al., 2003; ENGEL et al, 2007).

Estudos epidemiológicos sobre sepse no Brasil são raros, no entanto, há cinco estudos que descreveram as principais características da sepse no país. No estudo BASES (Brazilian Sepsis Epidemiological Study), desenvolvido em cinco UTIs de duas regiões brasileiras (sul e sudeste), encontrou-se uma incidência de sepse de cerca de 57 por 1.000 pacientes-dias sugerindo ser a sepse o maior problema de saúde pública das UTIs brasileiras (SILVA et al., 2004). O estudo multicêntrico PROGRESS realizado em conjunto com outros 35 países, contou com a participação de 7 UTIs brasileiras, e

revelou que as taxas de letalidade nas UTIs no Brasil foram maiores que aquelas de outros países em desenvolvimento e de países desenvolvidos (BEALE et al., 2003). Outro estudo epidemiológico multicêntrico avaliou a incidência de sepse em 75 UTIs de todas as regiões brasileiras e evidenciou-se um número de pacientes com sepse grave e choque séptico maior que os encontrados na Europa e EUA, outro dado importante é que nossos pacientes são mais graves e possuem um maior tempo de internação (SALES JR et al., 2006). Os custos e os modelos de tratamento da sepse nas UTIs brasileiras foram avaliados em outro estudo, que incluiu 21 UTIs nacionais públicas e privadas o qual demonstrou os altos custos para o tratamento da sepse e revelou uma significativa diferença no índice de mortalidade entre hospitais públicos e privados, 49,1% e 36,7% respectivamente (SOGAYAR et al., 2008).

Conde et al. (2013) confirmaram as altas taxas de mortalidade em hospitais públicos brasileiros, as quais são decorrentes das várias características que diferem entre hospitais públicos e privados. Em hospitais privados a maioria dos pacientes admitidos é idosa cujo quadro séptico é rapidamente reconhecido. Além disso, esses hospitais possuem diárias elevadas o que facilita o acesso a exames sofisticados, bem como tratamentos de última geração. Ao contrário, em hospitais públicos há maior prevalência de jovens com disfunção de múltiplos órgãos e com menor chance de um diagnóstico rápido de sepse. Os motivos para as altas taxas de mortalidade brasileira não são bem claros, mas acredita-se que a dificuldade de acesso à assistência médica, escassez de leitos nas UTIs, bem como o reconhecimento tardio do quadro séptico e a instituição de um tratamento inadequado contribuam com esses índices (CONDE et al., 2013; MORENO & MARTIN, 2014).

O diagnóstico e o tratamento da sepse tiveram um crescente progresso nas últimas décadas, no entanto, influenciando pouco no prognóstico desta doença (RANGEL-FRAUSTO, 2005). Os marcadores da resposta inflamatória aguda, incluindo febre, leucocitose, liberação da PCR, procalcitonina e os níveis de IL-6 não são específicos para a sepse, no entanto, eles possuem valor prognóstico de acompanhamento da resposta à terapêutica. A confirmação do diagnóstico depende da cultura do micro-organismo a qual é de grande importância para assegurar uma terapia antimicrobiana adequada (GUPTA; JONAS, 2006).



O tratamento da sepse passou por profundas e significativas modificações, principalmente devido à campanha mundial “*Surviving Sepsis Campaign*” a qual visava a redução da mortalidade por sepse em 25% em cinco anos e estabelecia uma rotina padrão para o atendimento do paciente séptico (DELLINGER et al., 2004). Segundo essa campanha o manejo da sepse deve incluir: ressuscitação inicial, identificação do sítio da infecção e do micro-organismo, antibioticoterapia, reposição volêmica, vasopressores, terapia ionotrópica, corticoterapia, PCR, transfusão sanguínea, ventilação mecânica, sedação, analgesia e bloqueio neuromuscular, controle glicêmico, profilaxia da trombose venosa profunda, profilaxia da úlcera de estresse e terapia de substituição renal (DELLINGER et al., 2013).

O estudo da sepse em humanos é complicado devido à gravidade da doença, à necessidade de intervenções imediatas e à heterogeneidade dos pacientes (DEJAGER et al., 2011). Por este motivo, os modelos experimentais são ferramentas indispensáveis para o melhor entendimento dos mecanismos moleculares e genéticos da sepse, bem como na busca de novas alternativas terapêuticas (BURAS et al., 2005; DEJAGER et al., 2011). Por outro lado, várias terapias que foram efetivas em animais falharam em humanos, sendo que muitas dessas falhas podem ser atribuídas ao uso de modelos inadequados (MUTLAK et al., 2013; SORDI et al., 2013). Recentemente, um estudo apontou que os modelos animais de inflamação não refletem o que acontece em humanos, justificando assim a falha na transposição de várias terapias que foram efetivas em modelo animal (SEOK et al., 2013). Entretanto, Hotchkiss et al. (2013) afirmam que modelos animais fornecem importantes percepções do mecanismo da sepse, embora haja diferença entre a resposta imune humana e de outros animais.

O modelo animal utilizado para o estudo da sepse deve reproduzir os sinais clínicos característicos da sepse como: vasodilatação, hipotensão, aumento do débito cardíaco, resposta ao tratamento e mortalidade (BURAS et al., 2005; WICHTERMAN et al., 1980). Vários modelos animais de sepse foram desenvolvidos, cada qual com características e aplicabilidades distintas, sendo que a maioria dos modelos utiliza a infecção intra-abdominal local para iniciar a resposta inflamatória sistêmica (DEJAGER et al., 2011; GARRIDO et al., 2004; RITTIRSCH et al., 2007). Os modelos de sepse mais utilizados são: injeção endovenosa ou intraperitoneal de endotoxinas (LPS) ou

patógenos viáveis (bactérias), injeção de fezes na cavidade peritoneal, introdução de cateter no cólon ascendente (CASP) (BURRAS et al., 2005), ligação e incisão do ceco (CLI) (SCHEIERMANN et al., 2009), ligação e dissecação do ceco (CLD) (MUTLAK et al., 2013) bem como ligação e perfuração do ceco (CLP) (RITTIRSCH et al., 2009; WICHTERMAN et al., 1980).

A sepse polimicrobiana induzida pelo modelo CLP é considerada padrão ouro pela literatura (DEJAGER et al., 2011). Esse modelo desenvolvido há mais de 30 anos é o que mais se assemelha ao quadro de sepse em humanos, pois envolve a combinação de três insultos: trauma tecidual devido à laparotomia, necrose em razão da ligação do ceco e infecção por causa do extravasamento de conteúdo fecal no peritônio (DEJAGER et al., 2011; WICHTERMAN et al., 1980). Pela técnica da CLP (Figura 2) há ligação do ceco logo abaixo da válvula ileocecal, perfuração do ceco com tamanho padronizado e liberação gradativa do conteúdo cólico para a cavidade peritoneal, induzindo peritonite a qual pode evoluir para um quadro de sepse e choque séptico (RITTIRSCH et al., 2009; WICHTERMAN et al., 1980).

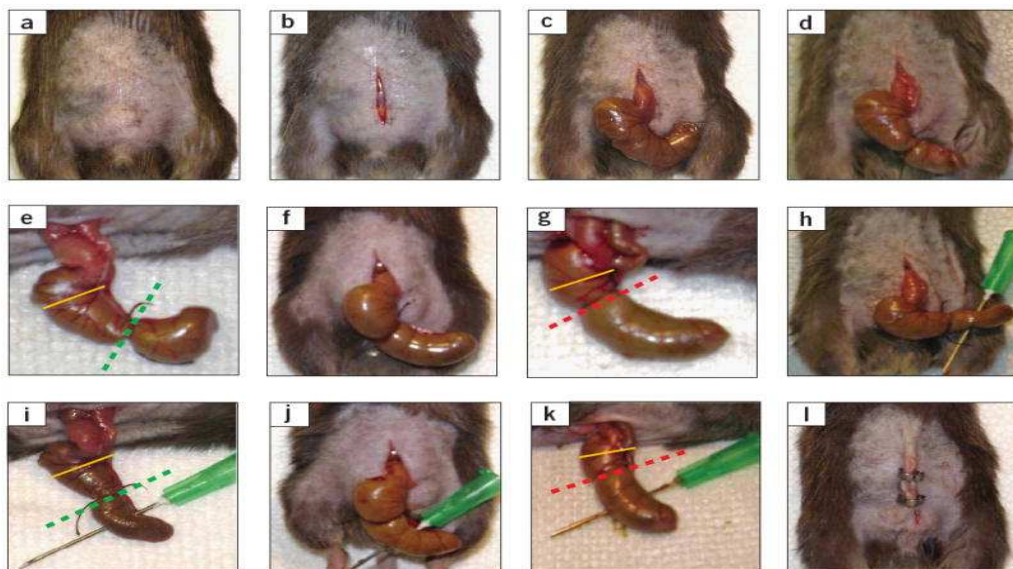


Figura 2 - Procedimento para indução da sepse pelo modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP) (RITTIRSCH, et al. 2009).

As principais desvantagens desse modelo são a variabilidade na gravidade da

sepse induzida devido às diferenças experimentais do modelo tais como quantidade de ceco ligada e de material fecal liberado na cavidade peritoneal, bem como a variabilidade no número e tamanho das perfurações. Rotineiramente, os estudos que utilizam esse modelo, suprimem informações quanto ao tamanho e o número de perfurações realizadas, embora tais informações sejam determinantes importantes da gravidade da sepse induzida, gerando assim, vários dados controversos na literatura obtidos por diferentes laboratórios (DEJAGER et al., 2011; RITTIRSCH et al., 2009).

O processo fisiopatológico da sepse inicia-se com a invasão ou infecção por um agente microbiano, o qual utiliza a desregulação do sistema vascular para invadir a circulação e produzir uma excessiva quantidade de mediadores inflamatórios. Estes mediadores, por sua vez, desencadeiam a inflamação sistêmica levando a um círculo vicioso devido ao aumento do dano tecidual, lesão vascular, falência de múltiplos órgãos levando à morte (COHEN, 2009). Em um quadro de sepse devem ser avaliados e combatidos três processos distintos, porém interligados, que acontecem concomitantemente: o foco infeccioso, as alterações hemodinâmicas e a resposta inflamatória local e generalizada (BONE et al., 1991). Uma vez invadido, a resposta do hospedeiro ao patógeno é mediada por respostas imunes inatas e adaptativas. Um dos principais componentes envolvidos na fisiopatologia da sepse é a exacerbada ativação da resposta imune inata, a qual é identificada pelo aumento dos fatores pró-inflamatórios após a infecção, como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-6 (IL-6) (HOTCHKISS; KARL, 2003; KORTEGEN et al., 2006).

A complexa interação entre diferentes tipos celulares, tecidos e citocinas dificulta o entendimento dessa patologia, a qual envolve mecanismos imunes, inflamatórios e a cascata de coagulação, o que culmina com um estado de intensa alteração da hemostasia em seus estágios mais avançados (DYSON et al., 2009). A resposta do hospedeiro e as características do organismo infectante são as principais variáveis fisiopatológicas da sepse, sendo que a progressão dessa patologia ocorre quando o hospedeiro não consegue conter a infecção primária (HOTCHKISS; KARL, 2003; RUSSEL, 2006).

Os componentes da parede bacteriana, ácido lipoteicóico e peptidoglicanos, derivados de bactérias gram-positivas e o lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias gram-

negativas, são os principais ativadores desta resposta do hospedeiro, sendo reconhecidos pelos receptores de membrana *Toll-like* (TLRs) (KORTEGEN et al., 2006; OPAL, 2007). Quando esses fragmentos bacterianos interagem com as proteínas ligadoras de polissacarídeos, um complexo é formado, o qual induz os macrófagos e outras células do sistema imune a liberarem mediadores pró-inflamatórios, incluindo as citocinas, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-6 que estimulam uma intensa resposta celular, com liberação de mediadores secundários como outras citocinas, fatores do complemento, prostanoídes, fator de agregação plaquetária (PAF), espécies reativas do oxigênio (ERO), quimiotaxia e ativação de granulócitos (GUPTA; JONAS, 2006; COHEN, 2009).

A liberação desses mediadores secundários representa o início da resposta do hospedeiro ao patógeno, a qual ocorre através da reativação das células fagocitárias e da cascata inflamatória, formando um ciclo vicioso. Sob condições fisiológicas normais, os mediadores pró-inflamatórios são regulados pelas citocinas anti-inflamatórias. Embora o TNF $\alpha$  não seja a primeira molécula produzida, este é um dos mais potentes indutores da inflamação. Sua produção induz a liberação de cálcio intracelular o que influencia a contração celular, a atividade enzimática e a função mitocondrial, incluindo a fosforilação oxidativa, o que afeta a produção de ATP (RANGEL-FRAUSTO, 2005; GUPTA; JONAS, 2006). A falha no controle dos mediadores pró-inflamatórios resulta no aumento da vulnerabilidade celular a qual se manifesta como uma resposta inflamatória sistêmica generalizada. Esta resposta exagerada resulta em ampla disfunção celular, causando diversos efeitos fisiológicos tais como: síndrome da aflição respiratória aguda, coagulação intravascular disseminada, diminuição da força contráctil do miocárdio, diminuição da resistência vascular sistêmica, hipotensão, acidose metabólica e hiperglicemia que eventualmente levam a disfunção de múltiplos órgãos e morte (RANGEL-FRAUSTO, 2005; GUPTA; JONAS, 2006).

Após a infecção por agentes patogênicos, respostas imunes são formadas para controlar os agentes da infecção. Na sepse, vários mecanismos moleculares de inflamação e dano celular estão envolvidos, entre eles o sistema de sinalização purinérgico e as ERO (SALVEMINI; CUZZOCREA, 2001). O sistema de sinalização purinérgica envolve três principais componentes: 1) nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares; 2) receptores purinérgicos e 3) ectoenzimas (ATKINSON et al., 2006).

Esse sistema desempenha um importante papel na modulação da resposta imune e inflamatória através de biomoléculas extracelulares como os nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP) e seu derivado nucleosídeo adenosina (BURNSTOCK, 2007a; ZIMMERMANN, 2000; RALEVIC; BURNSTOCK, 2003). Estas moléculas interagem com receptores purinérgicos presentes na superfície celular e desencadeiam cascatas enzimáticas que modulam diversos efeitos biológicos, incluindo inflamação, dor, proliferação e morte celular (Figura 3) (ATKINSON et al., 2006; RALEVIC; BURNSTOCK, 2003; YEGUTKIN, 2008).

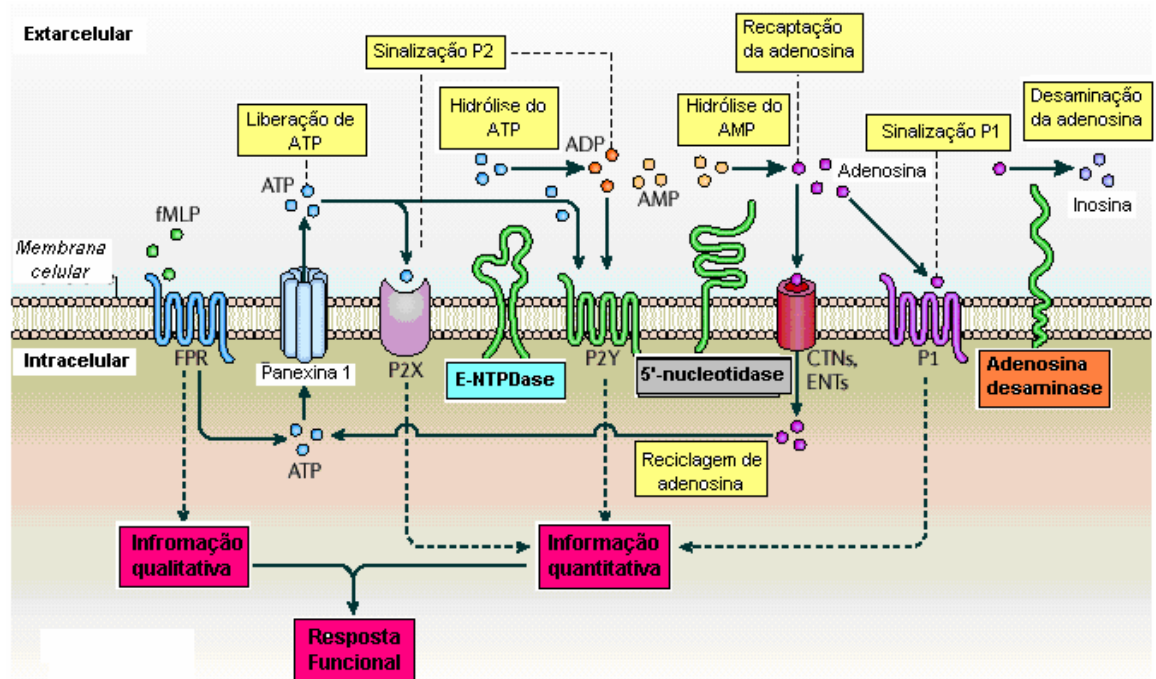


Figura 3- Representação dos componentes do sistema purinérgico (Adaptado de JUNGER, 2011).

Em condições fisiológicas, os nucleotídeos de adenina são encontrados no meio extracelular em baixas concentrações (DI VIRGILIO et al., 2001). Elevadas concentrações dessas biomoléculas são encontradas no meio extracelular representando dano ou estímulo de células por ação de patógenos. Sabe-se que o ATP

extracelular, por exemplo, quando em concentração micromolar, pode formar poros nas membranas celulares, resultando em mudanças osmóticas na célula (YOUNG et al., 1986), e também induzir dois efeitos antagônicos: a proliferação celular, quando em baixas concentrações, e a morte celular, quando em altas concentrações (DI VIRGILIO et al., 2001). Diversos estudos mostram que os nucleotídeos, ATP e ADP, secretados por leucócitos, plaquetas e células endoteliais danificadas, servem como mediadores capazes de modular o processo de inflamação e trombose vascular (Figura 4) (ELTZSCHIG et al., 2012; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Já a adenosina pode ser liberada no meio extracelular como resultado da degradação do ATP e ADP por enzimas específicas (YEGUTKIN, 2008), ou através de transportadores na membrana das células que transportam a adenosina de dentro das células para o meio extracelular (BOROWIEC et al., 2006).

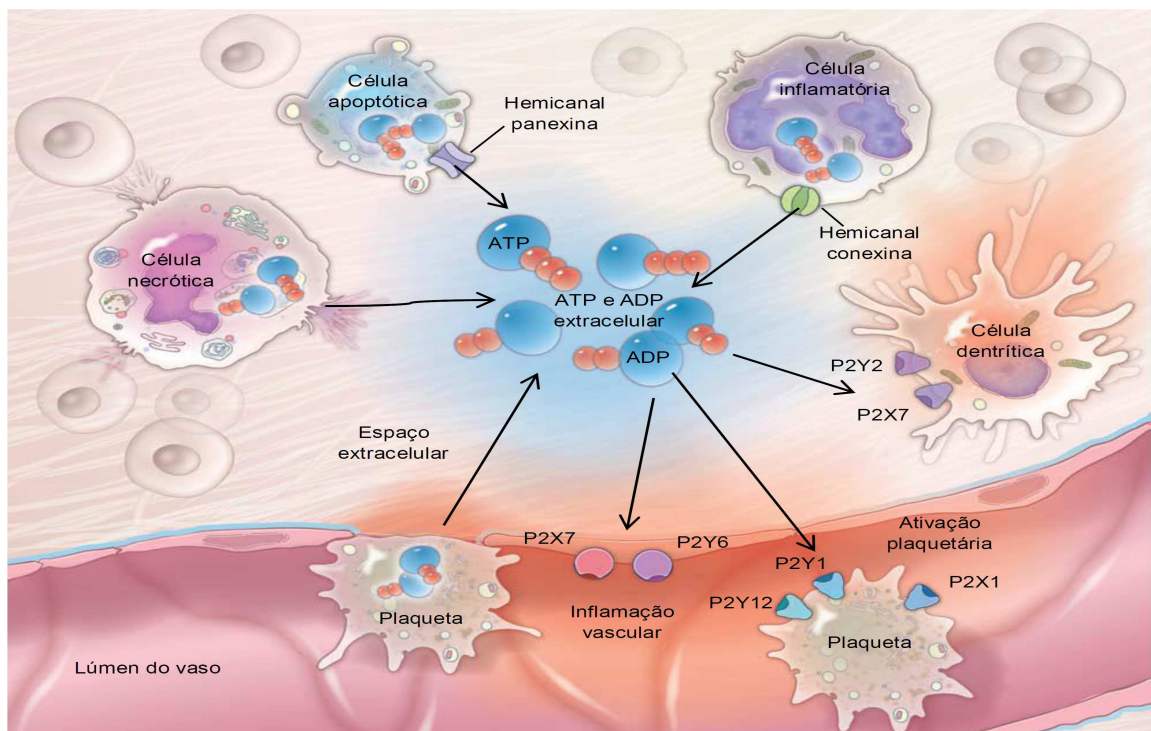


Figura 4- Liberação extracelular de ATP e ADP e ativação dos receptores de ATP (P2) durante a inflamação. (Adaptado de ELTZSCHIG, et al. 2012).

Os nucleotídeos extracelulares modulam várias funções teciduais como o fluxo sanguíneo, produção de secreções, indução de inflamação e reações imunes, além de influenciarem em processos que afetam o metabolismo celular e processos de adesão, ativação e migração celular. Além disso, essas moléculas estão relacionadas tanto aos estados fisiológicos, quanto aos patológicos, incluindo o desenvolvimento de várias patologias incluindo desordens do sistema imune e doenças neurodegenerativas e vasculares (ROBSON et al., 2006; JUNGER, 2011).

O ATP é um nucleotídeo presente em praticamente todas as células vivas possuindo um papel fundamental no metabolismo energético e sendo um importante modulador imune no meio extracelular (VITIELLO et al., 2012). O ATP é liberado no meio extracelular por dano ou estímulo celular por ação dos patógenos, sendo reconhecido pelo sistema imune como um sinal de alerta e participando em vários aspectos no estabelecimento da resposta imune. Esta molécula está envolvida no desenvolvimento da inflamação por uma combinação de ações como a secreção de citocinas pró-inflamatórias (INF- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ ) e a liberação de histaminas por mastócitos, provocando a produção de prostaglandinas (DI VIRGILIO 1998, LANGSTON et al., 2003). O ATP também exerce efeitos na tromborregulação, pois é liberado dos grânulos plaquetários, juntamente com o ADP, no momento que ocorre ativação das plaquetas. O ATP tem um duplo efeito sobre a agregação das plaquetas uma vez que em baixas concentrações ele induz a agregação plaquetária, enquanto que em altas concentrações ele provoca a inibição deste fenômeno (DI VIRGILIO et al., 2001; KEUREN et al., 2007; KOZIAK et al., 1999).

O nucleotídeo ADP é o produto gerado na hidrólise do ATP e não possui um papel definido nos linfócitos (DI VIRGILIO et al., 2001). O ADP é um importante sinalizador da regulação, ativação e recrutamento plaquetário, sendo reconhecido por induzir a agregação plaquetária, alterar a forma das plaquetas, aumentar o cálcio citosólico e inibir a adenilato ciclase ativada (VITIELLO et al., 2012). Já o AMP exerce função de sinalizador em situações de desequilíbrio do metabolismo, servindo também como substrato para a formação de adenosina (CUNHA, 2001; LATINI; PEDATA, 2001). A adenosina possui um importante papel como agente anti-inflamatório endógeno (CRONSTEIN, 1994) e imunossupressor, através da inibição da liberação de

citocinas, da adesão de células imunes e do funcionamento de linfócitos citotóxicos (CRONSTEIN et al., 1983).

Uma vez liberados no espaço extracelular, os nucleotídeos e nucleosídeo de adenina realizam suas ações biológicas através da ativação de receptores purinérgicos específicos presentes na superfície celular (DI VIRGILIO et al., 2001). Esses receptores são divididos em 3 principais famílias de acordo com suas propriedades farmacológicas e estruturais: receptores P2X, receptores P2Y e receptores P1 (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Os purinorreceptores do tipo P2X respondem apenas ao ATP; os P2Y respondem ao ATP e a outros nucleotídeos, enquanto que, os purinorreceptores do tipo P1 são mais eficientemente ativados por adenosina (DI VIRGILIO, et al. 2001; BURNSTOCK, 2007b)

As moléculas de ATP, ADP, AMP e adenosina após desempenharem suas funções orgânicas através da ativação de receptores purinérgicos específicos da membrana celular, devem ser metabolizadas a fim de manter seus níveis extracelulares em concentrações fisiológicas (ZIMMERMANN, 2001). Esse controle é realizado principalmente por uma cascata de enzimas conhecidas como ectoenzimas que estão localizadas na superfície celular e possuem o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (ZIMMERMANN, 2000). Estas enzimas degradam sequencialmente nucleotídeos e nucleosídeo, gerando seus respectivos metabólitos (BOROWIEC et al., 2006), finalizando a ativação dos receptores purinérgicos e evitando a dessensibilização desses receptores (JUNGER, 2011).

As ectonucleotidases são ectoenzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) e podem ser classificadas como família: Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDases), Ecto-Nucleotídeo pirofosfatases/fosfodiesterases (E-NPPs), Fosfatase Alcalina e Ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT), sendo amplamente distribuídas nos tecidos (ZIMMERMANN, 2000). Outra importante ectoenzima no metabolismo purinérgico é a adenosina desaminase (ADA), responsável pela desaminação do nucleosídeo adenosina formando inosina apresentando localização citosólica, mas podendo também estar localizada na superfície da membrana celular (ZIMMERMANN, 2001; YEGUTKIN, 2008). Estas enzimas atuam em conjunto, formando um complexo multienzimático (Figura 5) que tem





patogênicos (DRÖDGE, 2002). Os radicais livres são divididos em dois tipos: ERN (espécies reativas de nitrogênio) e ERO (espécies reativas de oxigênio). As ERO, por sua vez, apresentam ainda uma segunda subdivisão: radicalares (apresentam um elétron não-pareado), como: ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e radicais hidroxila ( $OH^\cdot$ ), peroxila ( $RO_2^-$ ) e alcoxila ( $RO^\cdot$ ) e não-radicalares (não apresentam um elétron desemparelhado), como: oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ácido hipocloroso (HOCl) (WHEELER, 2011).

As ERO são um dos grupos mais importantes de radicais livres que participam em várias funções fisiológicas e são parte integrante na defesa contra micro-organismos invasores (MAK, 2008; NATHAN; CUNNINGHAM-BUSSEL, 2013). A produção de ERO é parte integrante do metabolismo e está presente em condições fisiológicas normais, notadamente nos processos de produção de energia, regulação do crescimento celular, fagocitose, sinalização intracelular e síntese de hormônios e enzimas (MAK, 2008). Por outro lado, sua produção excessiva pode levar ao dano em lipídeos, proteínas, membranas e ácidos nucleicos e também serve como um importante sinalizador intracelular que amplifica respostas inflamatórias (OKTYABRSKY; SMIRNOVA, 2007). Os principais sítios e processos celulares produtores de oxidantes são a mitocôndria, as membranas celulares, o citoplasma e a enzima NADPH oxidase. Na sepse, destacam-se como principais fontes de ERO: o sistema monócito/macrófago, os polimorfonucleares (PMN) e as células do endotélio vascular (MUGUERCIA; PÉREZ, 2000; WHEELER, 2011).

O desequilíbrio no estado redox tem efeitos potencialmente deletérios sobre a biologia celular por isso, existem vários mecanismos antioxidantes envolvidos na proteção de células e organismos para um eventual dano causado por quantidades excessivas desses mediadores altamente reativos (GALLEY, 2011; HALLIWELL; WHITEMAN, 1990). O sistema de defesa antioxidante é importante para manutenção do processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos, impedindo que os danos oxidativos se amplifiquem, culminando em danos sistêmicos irreversíveis (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). As defesas antioxidantes inerentes a uma célula incluem defesas enzimáticas e não-enzimáticas. As principais defesas enzimáticas de que uma célula dispõe incluem: a glutatona peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido

dismutase (SOD). As defesas não-enzimáticas são constituídas pelas vitaminas C e E, o  $\beta$ -caroteno e os antioxidantes tiólicos como a glutathiona reduzida (GSH) e a glutathiona oxidada (GSSG) (VALKO et al, 2007). Os antioxidantes atuam em duas principais linhas: uma atua antes do oxidante causar dano, atuando como detoxificante que são: a GSH, a CAT, a SOD e a GPx, e uma defesa que atua após o dano para reparação da lesão, a qual compreende o ácido ascórbico, a glutathiona redutase e a GPx (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A avaliação do dano gerado pelos radicais livres pode ser identificada e quantificada pelos marcadores de dano oxidativo, onde a maioria dos ensaios inclui mensurações da peroxidação lipídica e de oxidação de proteínas, tanto *in vivo* quanto *ex vivo* (HWANG; KIM, 2007).

A peroxidação lipídica consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poli-insaturado, resultando na sua degradação oxidativa. Os fosfolipídios da membrana celular são particularmente suscetíveis ao processo de peroxidação, o que leva a alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana, resultando em perda da seletividade a troca iônica, liberação do conteúdo de organelas, tais como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, dentre eles o malondialdeído (MDA) cuja avaliação é realizada através do ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (DEL RIO et al, 2005).

A oxidação de proteínas tem grande importância, pois com o dano oxidativo ocorre fragmentação das cadeias e oxidação de quase todos os tipos de aminoácidos, com produção de compostos carbonilados, particularmente a partir de prolina, arginina e lisina. O conteúdo carbonílico de proteínas é amplamente utilizado como marcador de dano oxidativo em proteínas, sob condições de estresse oxidativo. Uma vez formados, os grupos carbonil são quimicamente estáveis, o que facilita tanto o seu armazenamento quanto a sua detecção (DALLE-DONE et al., 2006). Agentes que podem levar ao dano oxidativo proteico incluem o peróxido de hidrogênio, os xenobióticos, o tabagismo, a irradiação gama, a luz UV bem como os neutrófilos ativados (SHACTER, 2000). Visto que as proteínas desempenham diversas funções biológicas o dano a essas estruturas pode levar a muitas consequências, podendo produzir (ou não) um efeito específico na atividade biológica destas moléculas (DALLE-

DONNE et al., 2006). Dentre esses efeitos destacam-se: o dano a enzimas, o qual incorre em modificações severas do metabolismo e o dano a proteínas estruturais como, por exemplo, o fibrinogênio o que leva ao decréscimo da inibição da coagulação (SHACTER, 2000).

Na sepse, o estresse oxidativo resulta da ativação de células fagocíticas. Estudos clínicos e experimentais apontam que essa patologia está associada ao aumento da produção de ERO, diminuição das defesas antioxidantes e acúmulo de marcadores do estresse oxidativo. A disfunção da sinalização redox e a alteração na produção de ERO podem contribuir para a causa ou agravamento do quadro séptico. Estudos indicam que as ERO e a sinalização redox são importantes alvos para o entendimento da patofisiologia da sepse (MACDONALD, 2003; DAL-PIZZOL et al, 2010; WHEELER, 2011).

Alguns estudos indicam que as células imunes são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo devido ao seu alto conteúdo de gorduras poli-insaturadas na sua membrana plasmática, além disso, elas produzem grandes quantidades de ERO como parte da sua função fisiológica (NATHAN; CUNNINGHAM-BUSSEL, 2013; VICTOR, et al, 2004). Se por um lado altas concentrações de ERO estão envolvidas na manutenção do processo inflamatório, atuando como agente causal de dano a macromoléculas, por outro, sugere-se que baixas concentrações de ERO participem na regulação de diferentes funções tais como proliferação, biossíntese de hormônios, quimiotaxia, explosão oxidativa e apoptose (OKTYABRSKY; SMIRNOVA, 2007). Sabe-se que as células fagocitárias são ativadas pelo sistema da NADPH oxidase liberando grandes quantidades de ERO com o objetivo de eliminar o patógeno (NATHAN; CUNNINGHAM-BUSSEL, 2013) e que mutações em subunidades da NADPH oxidase originam neutrófilos com função bactericida diminuída (SAREILA et al, 2011).

Considerando o envolvimento do sistema purinérgico na regulação da resposta imune e do estresse oxidativo na sepse, este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade das ectoenzimas que degradam nucleotídeos de adenina em linfócitos e o perfil do estresse oxidativo em cérebro, coração, fígado e rins em modelo experimental de sepse induzida em ratos visando compreender melhor a fisiopatologia dessa doença.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o papel da hidrólise de nucleotídeos de adenina e o perfil de estresse oxidativo na fisiopatologia da sepse em um modelo experimental.

### **2.2 Objetivos específicos**

Em ratos com sepse induzida pelo modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP):

- Avaliar a atividade da E-NTPDase em linfócitos;
- Avaliar o perfil histológico em rins, fígado e pulmão;
- Avaliar a atividade antioxidante (NPSH e SOD) em cérebro, coração, fígado e rins;
- Avaliar a atividade pró-oxidante (Proteína Carbonil e TBARS) em cérebro, coração, fígado e rins;
- Determinar o agente patogênico da infecção (hemocultura);
- Avaliar os parâmetros hematológicos;

### **3 ARTIGO - INCREASED NTPDASE ACTIVITY IN LYMPHOCYTES DURING EXPERIMENTAL SEPSIS**

Publicado no periódico The Scientific World Journal.

O artigo completo encontra-se no anexo 2.

**4 MANUSCRITO - EVALUATION OF THE OXIDATIVE PROFILE IN RATS  
SUBMITTED TO SEPSIS**

Será submetido ao periódico Redox Report

## EVALUATION OF THE OXIDATIVE PROFILE IN RATS SUBMITTED TO SEPSIS

**Claudia M. Bertoncheli<sup>a\*</sup>, Livia G. Castilhos<sup>a</sup>, João Felipe P. Rezer<sup>a</sup>, Karine L. Silveira<sup>a</sup>, Leonardo L. Silveira<sup>a</sup>, Pedro Henrique Doleski<sup>a</sup>, Fernanda L. Cabral, Renata Pereira<sup>a</sup>, Daniel R. Stainki<sup>a</sup>, Heloisa E. Palma<sup>b</sup>, Sônia Terezinha A. Lopes<sup>b</sup>  
Daniela B. R. Leal<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup> Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>b</sup> Centro de Ciências Rurais, Departamento de Pequenos Animais, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

[liviagelain@gmail.com](mailto:liviagelain@gmail.com)  
[joaofeliperezer@gmail.com](mailto:joaofeliperezer@gmail.com)  
[kah\\_ls@yahoo.com.br](mailto:kah_ls@yahoo.com.br)  
[leolsilveira@yahoo.com.br](mailto:leolsilveira@yahoo.com.br)  
[ph\\_doleski@hotmail.com](mailto:ph_doleski@hotmail.com)  
[thorstenbergml@gmail.com](mailto:thorstenbergml@gmail.com)  
[renatynhap@gmail.com](mailto:renatynhap@gmail.com)  
[drstainki@uol.com.br](mailto:drstainki@uol.com.br)  
[heinloft@hotmail.br](mailto:heinloft@hotmail.br)  
[soniatldosanjos@hotmail.com](mailto:soniatldosanjos@hotmail.com)

### **\*Corresponding authors:**

Daniela Bitencourt Rosa Leal ([dbitencourtrosaleal@gmail.com](mailto:dbitencourtrosaleal@gmail.com)) and Claudia de Melo Bertoncheli ([c\\_bertoncheli@yahoo.com.br](mailto:c_bertoncheli@yahoo.com.br)) Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, prédio 20, 97105-900. Santa Maria, RS, Brazil Fax: + 55-55322-08242; Phone: + 55 55 3220 9581



**Abstract**

**Objective:** The present study was performed to investigate the oxidative profile in brain, heart, kidneys and liver of rats with induced sepsis.

**Methods:** To induce sepsis, a model of cecal ligation and puncture (CLP) was used. Male Wistar rats were divided into three groups (n = 10): (1) negative control, (2) sham and (3) CLP. Bacterial profile and hematological, antioxidant (NPSH and SOD) and prooxidant (carbonyl protein and TBARS) parameters were measured.

**Results:** *Escherichia coli* was identified as the pathogen. Hematological parameters showed leukocytosis and thrombocytopenia in animals of the septic group. There was no significant difference in NPSH content and SOD activity. The protein carbonyl content in brain and liver had no significant difference, while a decrease was observed in heart and kidney in the septic group. There was no significant difference in TBARS levels in brain; however these levels were decreased in heart and liver and increased in kidney from septic group.

**Discussion:** Our results suggest that the reduction in oxidative stress parameters in the heart and liver may be due to differences in the technique of induction of sepsis, added to altered neutrophil function and also the characteristics inherent to the pathogenic microorganism.

**Keywords:** SIRS; Sepsis; Carbonyl proteins; NPSH; SOD; TBARS

## Introduction

Sepsis is recognized as a systemic inflammatory response to infection with the presence of progressive tissue damage, where multiple organ failure is the most serious expression<sup>1,2</sup>. Despite extensive research, the mechanisms of organ failure in sepsis are still poorly understood<sup>3</sup>. It is known that the pathogenesis of sepsis is related to a complex interaction between the host and the pathogenic organisms, where the pathogens use the systemic vascular dysfunction to invade the circulation and activate of the innate immune system leading to an excessive production of inflammatory mediators<sup>4,5</sup>.

Among the various mediators involved in pathogenesis of sepsis the reactive oxygen species (ROS) stand out, amplifying the inflammatory process and playing an important role in the development of multiple organ failure and septic shock<sup>4</sup>. The properties of ROS include endothelial cell damage, formation of chemotactic factors, recruitment of neutrophils, lipid peroxidation, oxidation, DNA damage, release of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and formation of peroxynitrite<sup>6</sup>.

ROS collaborate to the host inflammatory response through either direct cellular toxicity or the activation of pro-inflammatory gene expression pathways<sup>7</sup>. The intense pro-inflammatory response activates neutrophils and macrophages that generate large amounts of ROS in order to destroy pathogens, however, this excess amount of ROS also eventually damage the cells of the host organism itself<sup>8</sup>. Cell injury increases the concentration of extracellular nucleotides, which are important signaling molecules during the inflammatory response<sup>9</sup>. In fact, our research group has been shown increased lymphocytic ATPase activity in this experimental model of sepsis as a likely way to reduce the high levels of ATP in the extracellular medium<sup>10</sup>.

Recent studies have shown that both pro-inflammatory and anti-inflammatory responses are important contributing factors to the sepsis complexity leading to immunosuppression<sup>2,5</sup>. Suppressed immune response impairs the removal of pathogenic agent, thus intensifying clinical features of sepsis<sup>8</sup>. As part of the innate immune system, neutrophils are activated by microorganisms in response to specific structures on surfaces of microbiological pathogens. When activated, neutrophils produce pro-inflammatory mediators (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, and IL-8), release granular enzymes, and produce nitric oxide (NO) and ROS which are involved in intracellular killing of bacteria<sup>5</sup>. In sepsis, there is an increased number of circulating neutrophils at various degrees of maturation, however, these revealed disrupted neutrophil functions, including impaired clearance of bacteria, reduced production of ROS and decrease recruitment to infected tissues<sup>5</sup>. Several mechanisms contribute to altered neutrophil roles; however these processes are complex and not fully clarified<sup>11</sup>.

Taking into account that ROS are potential mediators of the tissue injury and organ failure in sepsis, the present study aimed to evaluate antioxidant (NPSH and SOD) and prooxidant parameters (carbonyl protein and TBARS) in brain and peripheral organs (heart, kidney and liver) of rats with induced sepsis.

## **Materials and methods**

### *Reagents*

Malondialdehyde bisdimethylacetal (MDA, 99%, Aldrich 108383), (-)-epinephrine(+)bitartrate salt (Sigma E4375), and 2-thiobarbituric acid (sodium derivative, Aldrich S564508) were obtained from Sigma–Aldrich Chemical Co (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of highest purity.

### *Animals*

Male Wistar rats of 200–300 g body weight from the Central Animal House of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) were used in this experiment. Animals were kept on a natural day/night cycle (12-h light/12-h dark) at a constant temperature of  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  with free access to standard chow and water. All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee from UFSM (protocol under number: 33/2010).

### *Sepsis Induction and Samples Preparation*

Animals were randomly divided into three groups (10 rats in each group): (1) negative control, (2) sham and (3) CLP. To induce sepsis, it was used a model of cecal ligation and puncture (CLP) as previously described<sup>12</sup>. Briefly, animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (150 mg/kg i.m.) and xylazine (7.5 mg/kg i.m.). A midline laparotomy was performed, the cecum was exteriorized and ligated distal to the ileocecal valve, without causing intestinal obstruction. The cecum was perforated eight times using a 20-gauge needle and squeezed gently to extrude a small amount of fecal contents. The cecum was then returned to the peritoneal cavity and the incision was closed using two layers of sutures. In the negative control group there was no

exposure of the cecum, only exposure to anesthetic. Animals the sham group, the cecum was exteriorized without ligation and puncture. All rats received 1 ml of normal saline intraperitoneally for fluid loss immediately after the surgery. The animals were allowed free access to standard chow and water after induction of sepsis. After 24h of induction, animals were anesthetized with isoflurane and the whole blood was collected through cardiac puncture in tubes containing ethylenediamine tetraacetic acid and blood culture bottles. Brain, heart, kidney and liver tissues were gently collected.

#### *Bacteriological profile*

One ml of blood was collected under aseptic conditions to perform the blood cultures. This sample was transferred to specific medium for the growth of aerobic bacteria (Hemoprov®- Newprov).

#### *Hematological parameters*

A complete hematological profile was performed in the blood samples collected in the tubes containing EDTA as anticoagulant by automated hematology analyzer (SYSMEX XT-1800i, Roche Diagnostic, SA).

#### *Preparation of tissue homogenate*

The tissues were homogenized (1:10 weight/volume; w/v) in glass potter in Tris-HCl buffer and centrifuged at 2000 rpm for 10 minutes. Aliquots of the supernatant were stored at -20°C and used in the subsequent biochemical assays.

### *Non-protein thiols (NPSH)*

Non-protein thiols groups were determined as previously described<sup>13</sup>. Briefly, an aliquot of the homogenized tissue supernatant (1:10 w/v) was diluted (1:1) with 10% trichloroacetic acid (TCA), vortexed, and centrifuged at 2000 rpm for 10 minutes. Subsequently, the supernatant was reacted with 250  $\mu$ M DTNB in a final volume of 2 mL and the absorbance was read at 412 nm. A cysteine solution was used as reference standard. NPSH were expressed as  $\mu$ mol SH/g of tissue.

### *Superoxide dismutase (SOD) activity*

The SOD assay was performed according to Misra & Fridovich (1972)<sup>14</sup>. This method is based on reaction autoxidation adrenaline to adenochrome. The intermediate in this reaction is superoxide, which is scavenged by SOD. Results were expressed as U SOD/mg of protein. One SOD unit was defined as the enzyme amount to cause 50% inhibition of adrenaline autoxidation.

### *Carbonyl proteins*

Carbonyl proteins were measured by reaction with 2,4- dinitrophenylhydrazine (DNPH) following the method previously described<sup>15</sup>. Assays were performed in duplicate for both the DNPH-treated samples and the blanks. A 1-ml aliquot of the homogenized tissue supernatant (1:10 w/v) sample containing approximately 6 mg of protein was placed in each of the four tubes. The sample tubes received 200  $\mu$ l of 10 mM 2,4-DNPH while the blanks received the same volume of 2 N HCl. The reaction was left in the dark at room temperature for 60 minutes. The samples were vortexed every 15 minutes and then 500  $\mu$ l of 3% SDS, 2 ml of ethanol, and 2 ml of heptane were added to

each tube. After vortexing, the tubes were centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes. The pellets were washed in ethanol/ethyl acetate (1:1). Following this wash, 1 ml of 3% SDS was added to all the tubes and the absorbance was read at 370 nm. Carbonyl proteins were expressed as nmol carbonyl/mg of protein.

#### *Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)*

As an index of lipid peroxidation, we used thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) formation during an acid-heating reaction as previously described<sup>16</sup> with some modifications. Briefly, 200  $\mu$ l of homogenized tissue supernatant (1:10 w/v) samples were mixed with 500  $\mu$ l of 2.5 M acetic acid pH 3.4, 500  $\mu$ l of 0.8% thiobarbituric acid, 200  $\mu$ l of 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 100  $\mu$ l of distilled water. This mixture was then heated in a boiling water bath for 120 min. A malondialdehyde (MDA) solution was used as reference standard. TBARS were determined by the absorbance at 532 nm and were expressed as malondialdehyde equivalents (nmol MDA/mg of protein).

#### *Quantification of proteins*

The protein content was measured colorimetrically according to the Bradford method (1976)<sup>17</sup> using bovine serum albumin (1 mg/mL) as standard solution.

#### *Statistical analysis*

The statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey multiple comparison test.  $P < 0.05$  was considered to represent a significant difference among the analyses. All data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

## Results

### *Bacteriological profile*

Blood culture indicated the absence of bacterial growth in negative control and sham groups. In all animals from septic group was found the growth of *Escherichia coli* (data not shown).

### *Hematological parameters*

The hematological parameters are showed in Table 1. There was a decrease in red blood cell (RBC), hemoglobin, hematocrit (HCT) and platelets in septic group compared to the control group. There was no significant difference among the groups in mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC). There was an increase in white blood cell (WBC) in septic group compared to the control group. Regarding the differential count, it was observed a decrease in lymphocytes and eosinophils and an increase in neutrophils and monocytes from septic group when compared to the control group.

### *Non-protein thiols (NPSH)*

The NPSH levels in different tissues are shown in Figure 1. As can be observed there was no statistical difference among the groups in all the organs analyzed.

### *Superoxide dismutase (SOD) activity*

Figure 2 shows SOD activity in different tissues. Statistical analysis did not reveal any difference among groups in the organs evaluated.



### *Carbonyl proteins*

Figure 3 shows the oxidative damage to proteins. In the brain and liver there was no statistical difference among groups. Results demonstrated a decreased protein oxidation products in the heart ( $P<0.05$ ) and kidney ( $P<0.01$ ) tissues when compared to control groups.

### *Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)*

The index of lipid peroxidation is shown in Figure 4. In the brain there was no statistical difference among groups. It was observed a decreased levels of TBARS in heart ( $P<0.001$ ) and liver ( $P<0.001$ ) tissues in septic animals when compared to control groups. However, in kidney tissue TBARS levels were increased in animal with experimental sepsis in relation to control groups ( $P<0.05$ ).

## Discussion

In the present study, we evaluated the bacterial profile and the hematological, antioxidant and prooxidant parameters in rats submitted to experimental sepsis by cecal ligation and puncture model (CLP).

The CLP model is considered the gold standard for the study of sepsis and the intensity of the response depends on several factors such as: (i) the percentage of cecum ligated and thus amount of necrosis induced and (ii) the amount of microbial load that diffuses the peritoneum which depends on the number of perforations and the needle size used as well as on the pressure exerted to the cecal end<sup>12,18</sup>. This model induces polymicrobial sepsis mainly by enteric bacterias highlighting *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Bacteriodes fragilis* and *Enterococcus*<sup>19</sup>. In our study, we obtained positive blood culture for all animals undergoing experimental sepsis being identified *E. coli* as the causative agent.

The clinical features in sepsis comprise wide variety of signs and findings including the hemodynamic changes, low or high body temperature, reduced locomotor activity, reduced food and water intake, positive blood cultures and altered hematologic parameters such as leucopenia/leukocytosis and thrombocytopenia, in different stages of sepsis<sup>1</sup>. As expected, significant hematologic alterations were evident in septic group which, together with a positive blood culture, demonstrates the successful induction of sepsis performed in the rats used here.

The CLP induces various types of organ injury, but the mechanisms leading to this damage are complex and poorly understood<sup>20</sup>. ROS have been considered as potential mediators of tissue injury and organ failure, contributing to the pathology of sepsis as a promoter and mediator of systemic inflammatory response<sup>8</sup>. In this study,

measurements of the antioxidant defenses and also oxidative parameters were performed in brain, heart, kidney and liver tissue.

The antioxidant defense systems are major protective mechanisms against ROS. Its main goal is to keep the oxidation process within the physiological and susceptible levels of regulation, thus preventing the amplification of oxidative damage<sup>7</sup>. Our study showed that 24h after CLP surgery there was no significant change in antioxidant defenses (NPSH levels and SOD activity) in all tissues analyzed.

Regarding prooxidant parameters, we found no significant difference in the protein carbonyl content in brain and liver while in heart and kidney it was decreased from the septic group. There was no significant difference in TBARS levels in brain; however these levels were decreased in heart and liver and increased in kidney from septic group. In disagreement with our results, several studies have demonstrated an elevation of oxidative stress parameters in animal model<sup>21</sup>. The increase of these parameters was co-listed as a predictor of mortality in the CLP model<sup>22</sup>.

The discrepancy between our results and those of the literature could be explained by the different degrees of severity of sepsis that may be induced by CLP model<sup>23</sup>. The procedures used to obtain the CLP model, the number and size of the perforations and also the period in which the animals are subjected to CLP are not described in several studies. Moreover, variability in surgical procedures such as the dexterity of the surgeon and the inherent characteristics of the laboratory animals can profoundly influence the severity of the resulting model of disease, and thus justify the countless contradictory results in the literature<sup>12,18</sup>.

In addition, another suggestion for these different results is the deregulation of neutrophil function during sepsis<sup>5</sup>. In sepsis, there is the activation of phagocytes for

effective clearance of pathogenic microorganisms. Neutrophils are phagocytic cells that participate during the onset, progression and resolution of inflammation to kill invading microorganisms by production of inflammatory cytokines and chemokines and also generation ROS<sup>11,24</sup>. Some studies indicate that sepsis suppresses NADPH dehydrogenase gene, which is required for the production ROS<sup>11</sup>. Delano et al. (2011)<sup>25</sup> showed a decrease in the oxidative production in neutrophils during induced sepsis by *Pseudomonas aeruginosa*. Another study demonstrated a reduction in oxidant response due to the presence of the extracellular polysaccharide from *P. aeruginosa* which may impair neutrophil phagocytosis<sup>26</sup>. Moreover, neutrophils express a significant amount of Toll-like receptors (TLRs), which are important for pathogen recognition and activation of the cellular killing machinery<sup>27</sup>. The activation of these receptors contributes to the generation of ROS; however with the progress of sepsis these receptors become desensitized favoring a state of neutrophil hyporesponsiveness<sup>11</sup>.

It is important to point out that oxidative stress induced by systemic and intrarenal generation of ROS can exert renal parenchymal damage and could intensify renal microvascular and functional deregulation<sup>28,29</sup>. Our study revealed an increased TBARS levels in the kidney tissue after 24h CLP surgery. Cassol-Jr et al. (2010)<sup>21</sup> observed an increase in oxidative damage to lipids 6h after induction of CLP in kidney. Elevated levels of TBARS were listed as positive predictors for mortality in experimental sepsis<sup>21</sup>. During sepsis, the kidney is the most affected organ, being the acute kidney injury (AKI) the most frequent and severe complication in sepsis, and its involvement leads to a high risk of mortality<sup>30</sup>. In fact, the pathophysiology of AKI in sepsis is complex and includes several morphological changes as previously reported by our group for this CLP model<sup>10</sup>.

**Conclusion**

To our knowledge, the present study is the first carried out on model that showed a decrease in prooxidant parameters. In conclusion, we suggest that the decrease in parameters of oxidative stress in the cardiac and hepatic tissues may be due to differences in sepsis induction, and characteristics inherent to the pathogenic microorganism coupled with altered neutrophil function. Our findings may help clarify the role of oxidative stress in the immune response during sepsis. However, further studies are required to elucidate the role of ROS in an experimental model of sepsis the mechanisms that lead to decreased ROS in experimental sepsis, and how this reflects on the evolution of this pathology.

**Acknowledgments**

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE/UFSC), Brazil.

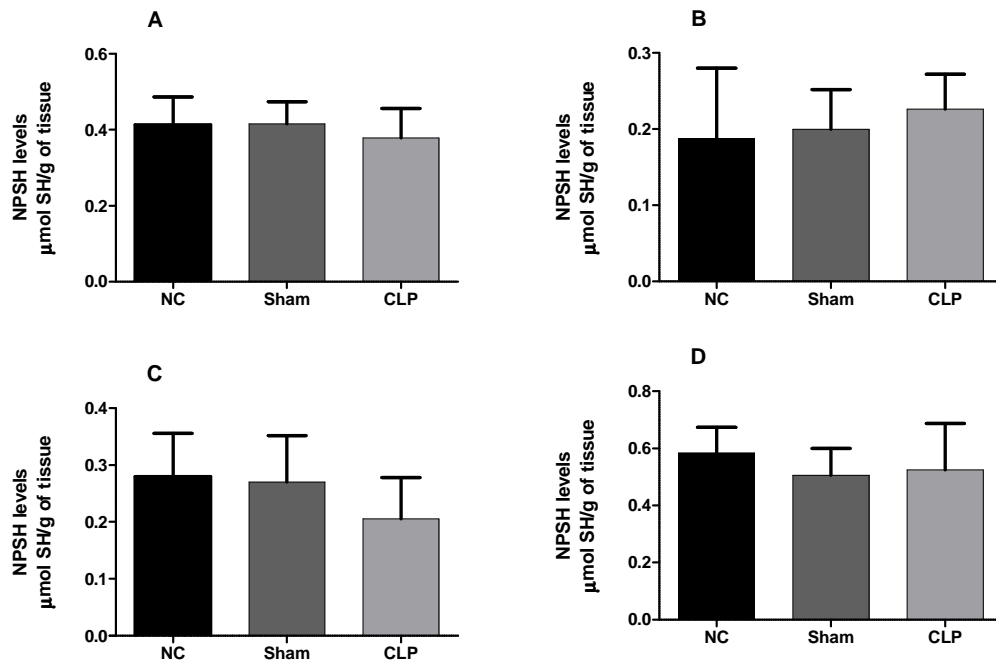
**Conflict of interest**

There are no actual or potential conflicts of interest.

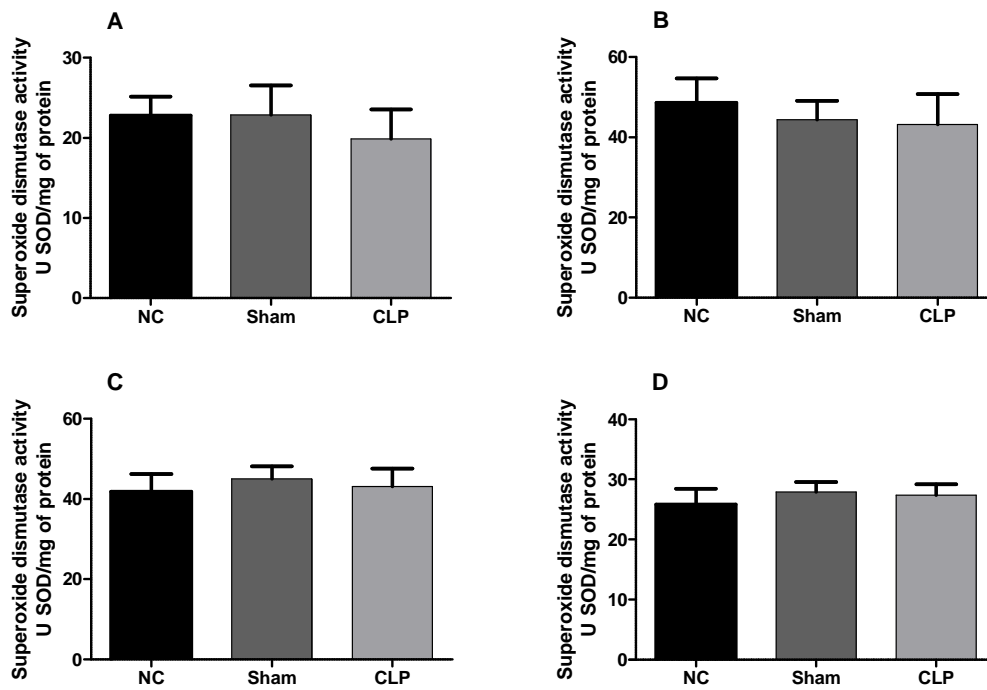
**Table 1:** Hematological parameters of rats with induced sepsis.

Groups	CN	CP	SG
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	$7.532 \pm 0.16^a$	$7.304 \pm 0.05^a$	$6.497 \pm 0.16^b$
Hemoglobin (g/dL)	$13.24 \pm 0.29^a$	$12.88 \pm 0.25^a$	$11.53 \pm 0.33^b$
HCT (%)	$42.60 \pm 0.87^a$	$41.20 \pm 0.58^a$	$36.71 \pm 1.12^b$
MCV (pg)	$56.58 \pm 0.70$	$56.41 \pm 0.77$	$56.52 \pm 1.12$
MCHC (g/dL)	$31.08 \pm 0.24$	$31.25 \pm 0.50$	$31.41 \pm 0.40$
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	$8.460 \pm 1.1^a$	$8.720 \pm 9.10^a$	$21.083 \pm 2.45^b$
Lymphocytes ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	$6.847 \pm 0.84^a$	$5.820 \pm 0.82^a$	$2.251 \pm 0.30^b$
Neutrophils ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	$1.289 \pm 2.44^a$	$2.486 \pm 0.53^a$	$17.941 \pm 2.5^b$
Monocytes ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	$0.215 \pm 0.09^a$	$0.302 \pm 0.07^a$	$0.856 \pm 0.16^b$
Eosinophils ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	$0.181 \pm 0.07^a$	$0.128 \pm 0.03^a$	$0.0 \pm 0.0^b$
Platelets ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	$707.4 \pm 17.46^a$	$757.8 \pm 37.28^a$	$532.0 \pm 51.61^b$

Groups: CN (negative control), CP (positive control) and SG (septic group). One-way ANOVA – Tukey's multiple comparison test. Data are means  $\pm$  SEM for n= 5-7 animals for group. Groups with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ). RBC: Erythrocytes; HCT: Hematocrit; MCV: Mean corpuscular volume; MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration; WBC: Leukocytes.

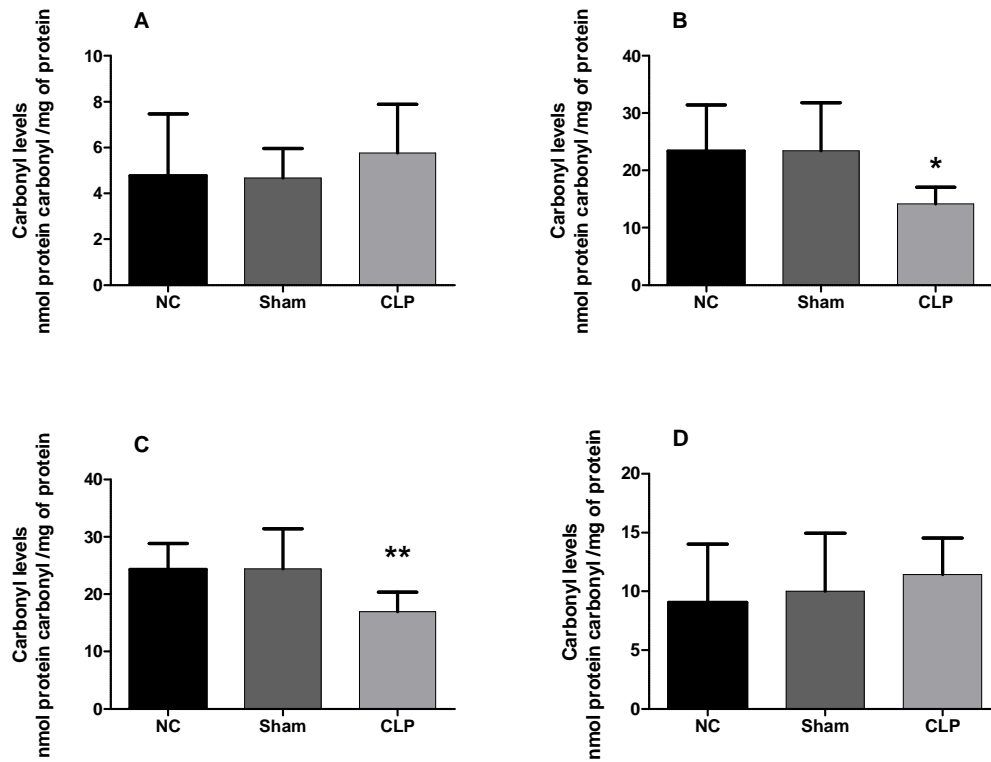


**Figure 1.** Non-protein sulfhydryl group levels in brain (A), heart (B), kidney (C) and liver (D) from rats with induced sepsis. NC - negative control, CLP - cecal ligation and puncture. Bars represent mean  $\pm$  SEM ( $P < 0.05$ ;  $n = 8-10$  for group). One-way ANOVA-Tukey Multiple Comparison Test.

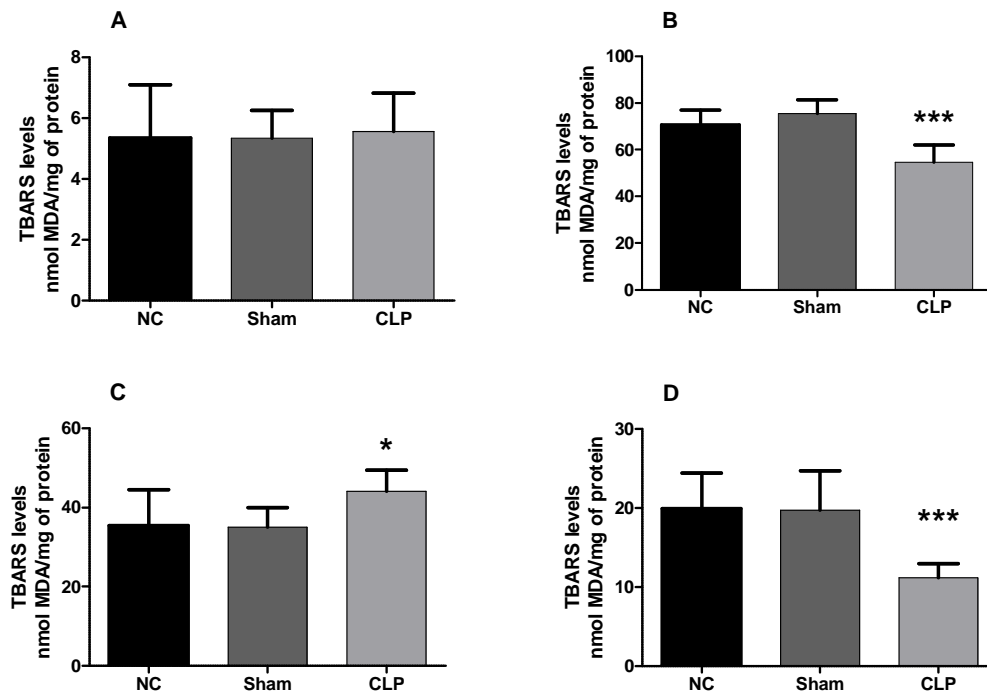


**Figure 2.** Superoxide dismutase (SOD) activity in brain (A), heart (B), kidney (C) and liver (D) from rats with induced sepsis. NC - negative control, CLP - cecal ligation and puncture. Bars represent mean  $\pm$  SEM ( $P < 0.05$ ;  $n = 8-10$  for group). One-way ANOVA-Tukey Multiple Comparison Test.





**Figure 3.** Carbonyl levels in brain (A), heart (B), kidney (C) and liver (D) from rats with induced sepsis. NC - negative control, CLP - cecal ligation and puncture. Bars represent mean  $\pm$  SEM ( $n=8-10$  for group). One-way ANOVA- Tukey Multiple Comparison Test. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with NC and Sham.



**Figure 4.** Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels in brain (A), heart (B), kidney (C) and liver (D) from rats with induced sepsis. NC - negative control, CLP - cecal ligation and puncture. Bars represent mean  $\pm$  SEM (n=8-10 for group). One-way ANOVA- Tukey Multiple Comparison Test. \*P<0.05, \*\*\*P<0.001 compared with NC and Sham.

## References

- 1 Angus DC, Poll TVD. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013; 369(9):840-851.
- 2 Vincent JL, Opal SM, Marshall JC and Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change. *Lancet* 2013; 381: 774-775.
- 3 Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2013; 50 (1): 23-36.
- 4 Andrades ME, Ritter C, Dal-Pizzol F. The role free radicals in sepsis development. *Front Biosci* 2009;1:277-287.
- 5 Hotchkiss RS, Monneret G and Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from células dysfunctions to immunotherapy. *Nature Rev Immunol* 2013, 13: 862-874.
- 6 Zimmermann JJ. Defining the role of oxyradicals in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care Med* 1995, 23: 616-617.
- 7 Wheeler DS. Oxidative stress in critically ill children with sepsis. *Open Inflamm J* 2011; 4(1-M9): 74-81.
- 8 Bosmann M, Ward PA. The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol*, 2013;34 (3):129-136.
- 9 Vitiello L, Gorini S, Rosano G, La Sala A. Immunoregulation through extracellular nucleotides. *Blood* 2012; 120 (3): 511-518.
- 10 Bertonechi CM, Zimmermann CEP, Jaques JAS et al. Increased NTPDase activity in lymphocytes during experimental sepsis. *Sci World J* 2012;941906.
- 11 Kovach MA and Standiford TJ. The function of neutrophils in sepsis. *Curr Opin Infect Dis* 2012; 25:321-327.
- 12 Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA and Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nature Protocols* 2009; 4 (1): 31–36.
- 13 Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82 (1): 70–7.
- 14 Misra HP and Fridovich I. The Role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247(10): 3170-3175.
- 15 Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186: 464-78.

- 16 Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95 (2): 351–8.
- 17 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 48–54.
- 18 Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol* 2011; 19 (4):198-208.
- 19 Nemzek JA, Hugunin KMS and Opp MR. Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being. *Comparative Med* 2008; 58 (2): 120-128.
- 20 Zhou J, Chen Y, Huang GQ, Li J, Wu GM, Liu L et al. Hydrogen-rich saline reverses oxidative stress, cognitive impairment, and mortality in rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture. *J Surg Res* 2012, 178: 390-400.
- 21 Cassol-Jr OJ, Comim CM, Silva BR, Hermani FV, Constantino LS, Felisberto F, et al. Treatment with cannabidiol reverses oxidative stress parameters, cognitive impairment and mortality in rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture. *Brain Res* 2010, 1348: 128-138.
- 22 Ritter C, Andrades M, Frota Junior ML, Bonatto F, Polydoro M, Klamt F. et al. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Intensive Care Med* 2003; 29:1782-1789.
- 23 Mutlak H, Jennewein C, Tran N, Mehring M, Latsch K, Habeck K, et al. Cecum ligation and dissection: a novel modified mouse sepsis model. *J Surg Res* 2013; 183: 321-329.
- 24 Kolaczowska E and Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Rev Immunol* 2013, 13: 159-175.
- 25 Delano MJ, Thayer T, Gabilovich S, Kelly-Scumpia KM, Winfield RD, Scumpia PO, et al. Sepsis induces early alterations in innate immunity that impact mortality to secondary infection. *J Immunol* 2011, 186: 195-202.
- 26 Mishra M, Byrd MS, Sergeant S, Azad AK, Parsek MR, McPhail L, et al. *Pseudomonas aeruginosa* PSL polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization. *Cell Microbiol* 2012, 14 (1): 95-106.
- 27 Weighardt H, Holzmann B. Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis. *Immunobiology* 2007, 212: 715-722.
- 28 Kurtz C, Panzer U, Anders HJ, Rees AJ. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nature Rev Immunol* 2013, 13: 738-753.

29 Legrand M, Mik EG, Johannes T, Payen D, and Ince C. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. *Mol Med* 2008, 14 (7-8): 502-516.

30 Wang Z, Holthoff JH, Seely KA, Pathak E, Spencer HJ, Gokden N, et al. Development of Oxidative Stress in the Peritubular Capillary Microenvironment Mediates Sepsis-Induced Renal Microcirculatory Failure and Acute Kidney Injury. *Am J Pathol* 2012, 180 (2): 505-516.

## 5 DISCUSSÃO

A sepse é uma condição clínica grave, que representa a resposta do hospedeiro a uma infecção e que possui uma alta taxa de mortalidade (MARIK, 2014; VINCENT et al, 2013). Essa enfermidade é caracterizada pela produção excessiva de mediadores inflamatórios e pela excessiva ativação de células inflamatórias. Como consequência dessa resposta exacerbada ocorre o comprometimento de vários órgãos levando a desregulação do endotélio vascular, acompanhado pela perda da integridade da membrana celular que evolui para a morte celular, e subseqüentemente para falência de múltiplos órgãos (GOLDENBERG et al., 2011, RITTIRSCH et al, 2008.; STEARNS-KUROSAWA et al., 2011). As análises histológicas do fígado, pulmão e rins realizadas no presente estudo demonstraram várias mudanças morfológicas nos órgãos do grupo séptico tais como congestão vascular, necrose e infiltrado de células mononucleares. Essas alterações são condizentes com o quadro séptico.

Os nucleotídeos de adenina são comprovadamente moléculas importantes no desempenho de várias funções orgânicas (MEI et al., 2010). No sistema imune, estas biomoléculas desempenham várias funções, dentre elas, o estímulo para proliferação de linfócitos, a geração de ERO e a secreção de citocinas e quimiocinas (DI VIRGILIO et al., 2009). Sua presença na circulação pode desencadear uma ampla variedade de ações dependendo de suas concentrações e de sua ligação a receptores específicos. Em razão disto, também é de grande importância que exista um sistema responsável pelo controle dos seus níveis extracelulares o qual é realizado por uma variedade de enzimas ancoradas na membrana plasmática das células (YEGUTKIN, 2008). Entre essas enzimas destacam-se as E-NTDases que possuem um importante papel nos mecanismos de tromborregulação, neurotransmissão, neuromodulação e nas respostas imunes e inflamatórias (BURNSTOCK, 2012).

Alterações na atividade das E-NTPDase têm sido descritas em várias patologias e em modelos experimentais indicando que essas enzimas possam ser um importante parâmetro biológico (BACH et al., 2010; BECKER et al., 2010; DUARTE et al., 2007; JAQUES et al., 2012; LEAL et al., 2005; SOUZA et al., 2012; ZANINI et al., 2013). Diante do exposto, em um primeiro momento, o presente estudo avaliou a atividade da

E-NTPDase em linfócitos obtidos de ratos com sepse induzida, com o intuito de contribuir para o melhor entendimento dessa patologia.

A determinação da atividade da enzima E-NTPDase revelou um aumento na hidrólise do nucleotídeo ATP em animais sépticos quando comparados ao grupo controle. Em relação à hidrólise do nucleotídeo ADP não se observou diferença significativa entre os grupos. Sabe-se que o aumento do ATP extracelular é diretamente relacionado com o dano tecidual (VITIELLO et al., 2012). Altos níveis de ATP plasmático foram recentemente documentados em ratos sépticos, utilizando o modelo CLP, e relacionados com a ativação de neutrófilos. O aumento da ativação dessas células pode proteger o hospedeiro do micro-organismo invasor, no entanto, a sua excessiva ativação pode contribuir para o dano tecidual (SUMI et al., 2014).

O ATP extracelular é um importante modulador imune. Esse atua como um mediador durante o processo inflamatório através da ligação a receptores purinérgicos P2, os quais são amplamente expressos em células do sistema imune (VITIELLO et al., 2012). Sua liberação para o meio extracelular pode ocorrer como consequência do dano celular, hipóxia, estimulação osmótica, mecanismos de estresse ou por estímulo celular por ação de patógenos (ANTONIOLI et al., 2013; SCHENK et al., 2008; TRAUTMANN, 2009). Nessas condições, o ATP é interpretado pelo sistema imune como um sinal de dano ou DAMP (Padrão Molecular Associado ao Dano) emitido pelos tecidos lesados que permite o reconhecimento e a eliminação de células danificadas e apoptóticas, bem como estimula o início do reparo de tecidos (CHEKENI et al., 2010; ELLIOTT et al., 2009; JUNGER, 2011).

Na sepse, provavelmente, o ATP seja liberado como consequência do processo inflamatório, bem como por células apoptóticas e em necrose. Na resposta imune, o ATP pode ser liberado no interior das sinapses imunes ou por células do endotélio vascular danificadas por moléculas efetoras do sistema imune (JUNGER, 2011). Os linfócitos T secretam ATP pelos canais de panexina 1, os quais medeiam a permeabilidade da membrana durante os processos apoptóticos (VITIELLO et al., 2012). Esses canais podem ser ativados pela despolarização da membrana e por mudanças nas concentrações de  $Ca^{2+}$  intracelular, no entanto, na maioria das vezes sua abertura é controlada pelo receptor P2X7 (TRAUTMANN, 2009).

Estudos recentes com modelos animais demonstraram a liberação de ATP de tecidos inflamados, resultando em uma concentração extracelular que estimula os receptores P2X7 (BOURS et al., 2011). Nesse contexto, o ATP extracelular induz a ativação dos receptores P2X7 e dos canais de Panexina 1, que ativam o complexo inflamassoma-NALP3, o qual é um conjunto de moléculas da imunidade inata que controla as caspases inflamatórias e induz a produção e liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 (DI VIRGILIO, 2007; JUNGER, 2011; VITIELLO et al., 2012). Esse processo induz a uma resposta inflamatória e consequentemente à morte celular (TRAUTMANN, 2009).

Portanto, sabendo-se que a liberação aguda de ATP, assim como, as altas concentrações desse nucleotídeo no meio extracelular, promovem a ativação de células imunes e induzem a uma resposta pró-inflamatória, sugere-se que as alterações enzimáticas observadas nos linfócitos de ratos sépticos, foram provavelmente induzidas como uma resposta dinâmica para eliminar os níveis elevados de ATP resultantes do processo de morte celular, ou seja, um mecanismo compensatório.

Entre os vários mecanismos de inflamação e dano celular que contribuem para a patogênese da sepse destacam-se as ERO, as quais ampliam o processo inflamatório e contribuem para os principais efeitos deletérios dessa patologia, como hipóxia tecidual e a falência de órgãos (ANDRADES et al., 2009). As características pró-inflamatórias das ERO são relacionadas com a lesão do endotélio, recrutamento de neutrófilos, lipoperoxidação, danos ao DNA, liberação de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e formação de peroxinitrito (ZIMMERMANN, 1995). Normalmente, uma complexa rede de antioxidantes regula a atividade das ERO visando diminuir as concentrações e controlar os danos causados por esses radicais livres (GALLEY, 2011). Assim, sabendo-se da intensa resposta inflamatória, bem como a evolução para a disfunção de múltiplos órgãos que ocorre na sepse, este estudo também teve por objetivo avaliar os parâmetros antioxidantes e pró-oxidantes em cérebro, coração, fígado e rins de ratos submetidos à sepse experimental.

Em relação aos resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante não se observou diferença significativa no conteúdo NPSH e na atividade da SOD em nenhum órgão analisado. Os mecanismos de defesa antioxidante desempenham suas funções por diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação de ERO (sistema de prevenção), neutralizando as espécies reativas (sistemas de varredores) e reparando e



reconstituindo os danos ocasionados por elas (sistemas de reparo) (CLARKSON & THOMPSON, 2000). Em condições fisiológicas, o equilíbrio entre a produção e a eliminação de ERO é mantido pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), as quais representam a primeira linha de defesa endógena de neutralização das ERO, e pelas defesas não enzimáticas compostas, principalmente, por antioxidantes hidrossolúveis, como a glutathione (GSH), os tióis não proteicos (NPSH) e o ácido ascórbico.

É interessante observar que, mesmo a nível fisiológico, não há uma total prevenção na produção/atuação das ERO, pois em pequenas concentrações, estas moléculas possuem funções celulares importantes como controle da ventilação respiratória, apoptose, diferenciação e desenvolvimento celular, aderência de leucócitos a células endoteliais ou mesmo na ativação da resposta imunológica específica contra patógenos no processo inflamatório (DRÖGE, 2002). Diante do exposto, faz-se necessário avaliar alguns componentes do mecanismo de defesa antioxidante visando a melhor compreensão da ação desse sistema na sepse induzida.

Quanto aos parâmetros pró-oxidantes, o teor de proteína carbonil não apresentou diferença significativa no cérebro e no fígado enquanto nos tecidos cardíaco e renal observou-se um decréscimo no grupo séptico em relação aos demais grupos. Não foi observada nenhuma diferença significativa nos níveis de TBARS no cérebro, no entanto estes níveis estavam reduzidos no coração e no fígado e aumentados no tecido renal.

Nossos resultados não estão de acordo com a grande parte da literatura, onde estudos indicam que a sepse esta associada ao aumento desses parâmetros (CASSOL-JR et al., 2010; RITTER et al., 2003). No entanto, sugere-se que, as reduções nos níveis dos parâmetros pró-oxidantes, pode ter ocorrido devido a diferenças na indução da sepse pelo modelo CLP entre os diferentes grupos de pesquisa. Nesse modelo, fatores como a quantidade de ceco ligado, o tamanho da agulha utilizada e o número de perfurações indicam o grau de gravidade desse modelo, e podem estar relacionados às diferentes respostas encontradas na literatura (ZANOTTI-CAVAZZONI & GOLDFARB, 2009). Além disso, poucos autores referem-se ao tempo de indução da sepse.

Sugere-se também, que esses resultados contraditórios possam estar relacionados com a função dos neutrófilos durante a sepse, já que um estudo recente demonstrou inúmeras anormalidades nessas células nas primeiras horas da sepse, como o aumento de neutrófilos circulantes em diferentes graus de maturação (TAMAYO et al., 2012). Esses neutrófilos imaturos, por sua vez, possuem suas funções alteradas, incluindo: diminuição da eliminação bacteriana, redução da produção de ERO e diminuição da atividade quimiotática (paralisa dos neutrófilos), sendo que esta última função já está bem estabelecida na literatura por contribuir na patogênese da sepse e estar diretamente relacionada à mortalidade (ALVES-FILHO et al., 2010; DRIFTE et al., 2013; KOVACH & STANDIFORD, 2012).

A liberação de ERO ocorre em vários processos metabólicos, principalmente, durante o processo de fagocitose. Em alguns tipos celulares, como neutrófilos e macrófagos, as ERO têm a finalidade de eliminar bactérias invasoras (BERGER & CHIOLERO, 2007; FIALKOW et al., 2007). Quando o patógeno invade o organismo do hospedeiro esse é inicialmente reconhecido por receptores de membrana *Toll-like* (TLR), que induzem a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias, geração de ERO, fagocitose e a produção de armadilhas extracelulares neutrofílicas (*Neutrophils Extracellular Traps- NETs*) (ALVES-FILHO et al., 2010). Os receptores TLR são importantes para o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou DAMPs, bem como para a ativação dos mecanismos de morte celular contribuindo para a geração de ERO, no entanto, a exposição prolongada a essas moléculas torna esses receptores tolerantes, resultando na redução de citocinas pró-inflamatórias e inibição da sinalização por essa via (ALVES-FILHO et al., 2010; WEIGHARDT & HOLZMANN, 2007).

Os neutrófilos, portanto, são essenciais para controlar a invasão por micro-organismos na sepse. Nessa patologia ocorre o aumento do número de neutrófilos imaturos (em vários graus de maturação) os quais apresentam atividade bactericida diminuída, devido à redução da produção de ERO, e, além disso, ocorre perda da atividade quimiotática (HOTCHKISS et al., 2013). A detecção dessas formas imaturas é visualizada através do esfregaço sanguíneo, onde se observa um acentuado desvio a esquerda, indicando, com isso, o aumento da atividade medular, com liberação de

formas imaturas da medula óssea para a corrente circulatória. Pela análise dos dados hematológicos realizados neste experimento, observamos que os animais do grupo séptico estavam neutrofílicos em relação aos demais grupos, indicando, assim a presença de formas imaturas.

O presente trabalho, portanto, demonstrou o aumento da hidrólise do ATP, assim como, a redução dos parâmetros do estresse oxidativo em ratos com sepse induzida pelo modelo CLP.

## 6 CONCLUSÃO

I. A atividade da E-NTPDase em linfócitos foi alterada em ratos sépticos. Houve um aumento na hidrólise de ATP a qual pode ter ocorrido devido ao aumento do dano celular que conseqüentemente libera grandes quantidades de ATP para o meio extracelular. A hidrólise de ADP não foi alterada.

II. Foi observada, pelas análises histológicas, nos animais submetidos à sepse experimental, congestão vascular, necrose e infiltrado inflamatório mononuclear.

III. Em relação à atividade antioxidante os animais sépticos não apresentaram diferença significativa em nenhum órgão analisado.

IV. Os parâmetros pró-oxidantes demonstraram redução significativa nos órgãos analisados. Sendo assim, mais estudos são necessários para melhor entender os mecanismos envolvidos na possível diminuição dos parâmetros do estresse oxidativo 24h após a indução da sepse.

V. *E. coli* foi identificada como agente etiológico da sepse induzida.

VI. Observaram-se, pela análise dos parâmetros hematológicos, alterações condizentes com o quadro séptico, como leucocitose e trombocitopenia.

## **7 PERSPECTIVAS**

Muitos aspectos precisam ainda ser esclarecidos em relação aos resultados obtidos nas análises dos parâmetros oxidativo. Sendo assim uma terceira etapa de estudo está em andamento visando elucidar e justificar os resultados obtidos através de novas análises dos parâmetros já analisados e do acréscimo de outros componentes da atividade antioxidante. Nessa nova etapa, os parâmetros foram avaliados 6, 12 e 24 horas após a indução com o intuito de avaliar a progressão da resposta inflamatória induzida pela sepse.

Além disso, novos ensaios enzimáticos da atividade da E-NTPDase foram realizados, bem como foi acrescentada a atividade da E-ADA nos diferentes tempos de indução, com o objetivo de verificar mudanças no perfil enzimático desses animais.

## 8 REFERÊNCIAS

ALBERTI, C. et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicenter cohort study. **Intensive Care Medicine**, v. 28, p. 108-121, 2002.

ALVES-FILHO, J. C.; SPILLER, F.; CUNHA, F. Q. Neutrophil paralysis in sepsis. **Shock**, v.34, n. Suppl 1, p.15-21, 2010.

ANDRADES, M. E.; RITTER, C.; DAL-PIZZOL, F. The role free radicals in sepsis development. **Frontiers in Bioscience**,v.1, p.277-287, 2009.

ANGUS, D. C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**, v. 29, n. 7, p. 1303-1310, 2001.

ANGUS, D. C.; POLL, T. V. D. Severe Sepsis and Septic Shock. **The New England Journal of Medicine**, v.369, n.9, p.840-851, 2013.

ANNANE, D. et al. Current Epidemiology of septic shock: The CUB-Rea Network. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 168, p. 165-172, 2003.

ANTONIOLI, L. et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in Molecular Medicine**, v.19, n.6, p. 355-367, 2013.

ATKINSON, B. et al. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic target. **Blood cells, Molecules and Diseases**, v. 36, n. 2, p. 217-222, 2006.

BACH, B. C. et al. Immunotherapy for pythiosis: effect on NTPDase activity in lymphocytes of an experimental model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 718-722, 2010.

BEALE, R. et al. PROGRESS (Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis): a preliminary report of an international internet-based sepsis registry. **Chest**, v. 124, p. 224, 2003.

- BECKER, L. V. et al . Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Biochemistry**, v. 43, p. 1096-1100, 2010.
- BERGER, M. M.; CHIOLÉRO, R. L. Antioxidant supplementation in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. **Critical Care Medicine**, v.35, n.9, p. 584-590, 2007.
- BONE, R. C. The pathogenesis of sepsis. **Annals of Internal Medicine**, v. 115,p. 457-469, 1991.
- BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1644-55, 1992.
- BONE, R. C., GRODZIN, C. J., BALK, R. A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest** ,v. 112, p. 235-243, 1997.
- BOROWIEC, A. et al. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, p. 269-278,2006.
- BOURS, M. J. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 358-404, 2006.
- BOURS, M. J. et al. P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation. **Frontiers in Bioscience**, v.3, p.1443-56, 2011.
- BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 659-797, 2007a.
- BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 64, p. 1471-83, 2007b.
- BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. **Bioessays**, v.34, p. 218–225, 2012.

BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 854-865, 2005.

CASSOL-JR, O. J. et al. Treatment with cannabidiol reverses oxidative stress parameters, cognitive impairment and mortality in rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture. **Brain Research**, v.1348, p. 128-138, 2010.

CHEKENI, F. B. et al. Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. **Nature**, v.467, n.7317, p.863-7, 2010.

CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.72, n.2, p. 637-646, 2000.

COHEN, J. Sepsis. **Medicine**, v. 37, n. 10, p. 562-565, 2009.

CONDE, K. A. P. et al. Differences in sepsis treatment and outcomes between public and private hospital in Brazil: a multicenter observational study. **PLOS ONE**, v.8, n.6, e64790, 2013.

CRONSTEIN, B. N. et al. Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. **The Journal Experimental Medicine**, v. 158, p. 1160-1177, 1983.

CRONSTEIN, B. N. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 76, p. 5-13, 1994.

CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, v. 38, p. 107-25, 2001.

CUZZOCREA, S. et al. Antioxidant Therapy: A New Pharmacological Approach in Shock, Inflammation, and Ischemia/Reperfusion Injury. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 1, p. 135-159, 2001.

DAL-PIZZOL, F. et al. Oxidative mechanisms of brain dysfunction during sepsis. **Neurochemical Research**, v.35, p.1-12, 2010.



DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.10, p.389-406, 2006

DEJAGER, L. et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends Microbiol**, v.19, n.4, p.198-208, 2011.

DELLINGER, R. P. et al. for the Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 32, n. 3, p. 858-873, 2004.

DELLINGER, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012. **Crit Care Med**, v.41, n.2, p.580-637, 2013.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases** , v.15, p.316-328, 2005.

DRIFTE, G. et al. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. **Critical Care Medicine**, v.41, n.3, p.820-32, 2013.

DREIHER, J. et al. Temporal trends in patient characteristics and survival of intensive care admissions with sepsis: A multicenter analysis. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 3, p. 855-860, 2012.

DI VIRGILIO, F. ATP as a death factor. **Biofactors**, v. 8, p. 301-303, 1998.

DI VIRGILIO, F. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v. 97, n. 3, p. 587-600, 2001.

DI VIRGILIO, F. Liaisons dangereuses: P2X7 and the inflammasome. **Trends Pharmacological Science**, v.28, p.465-472, 2007.

DI VIRGILIO, F., JEAN-MARIE BOEYNAEMS, J.M.; ROBSON, S.C. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. **Current Opinion in Pharmacology**, v.9, p.507–513, 2009.

DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, v.82, p.47-95, 2002.

DUARTE, M. M. M. et al . Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. **The FEBS Journal**, v. 274, p. 2707-2714, 2007.

DYSON, A.; SINGER, M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to clinical setting? **Crit Care Med**, v.37, p.S30, 2009.

ELLIOTT, M. R. et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. **Nature**, v.461, n.7261, p.282-6, 2009.

ELTZCHIG, H. K. et al. Purinergic signaling during inflammation. **The New England Journal of Medicine**, n.13, p.2322-2333, 2012.

ENGEL C. et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. **Intensive Care Medicine**, v. 33, p. 606-618, 2007.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p.61-68, 1997.

FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G. P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radical Biology & Medicine**, v.42, p.153-164, 2007.

FUNK, D. J.; PARRILLO, J. E.; KUMAR, A. Sepsis and septic shock: a history. **Critical Care Medicine**, v. 25, p. 83-101, 2009.

GALLEY, H.F. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. **British Journal of Anaesthesia**, v.107, n.1, p.57-64, 2011.

GARRIDO, A. G.; FIGUEIREDO, L. F. P.; SILVA, M. R. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 82-88, 2004.

GODING, J. W. Ecto-enzymes: physiology meets pathology. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 67, p. 285-311, 2000.

GOLDENBERG, N.M. et al. Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis. **Science Translational Medicine**, v.3, n.88, p. 88ps25, 2011.

GUPTA, S.; JONAS, M. Sepsis, septic shock and multiple organ failure. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 7, n. 5, p. 143-146; 2006.

HALLIWELL, G.; GUTTERIDGE, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v.142, p.231–255, 2004.

HENKIN, C. S. et al. Sepsis: uma visão atual. **Scientia Medica**, v.19, n.3, p.135-145, 2009.

HOESEL, L. M. WARD, P. A. Mechanisms of inflammatory response syndrome in sepsis. **Drug Today: Disease Mechanisms**, v. 1, n. 3, 2004.

HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. The pathophysiology and treatment of sepsis. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 2, p. 138-150, 2003.

HOTCHKISS, R. S.; MONNERET, G.; PAYEN, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. **Nature Review Immunology**, v.13, p. 862-874, 2013.

HWANG E. S.; KIM G. H. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. **Toxicology**, v.229, n.1-2, p. 1-10, 2007.

JAQUES, J.A. et al. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. **Cell Biochemistry and Function**, v. 31, p. 395-399, 2012.

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews. Immunology**, v. 11, p. 201-212, 2011.

KEUREN, J. F. et al. Microparticles adhere to collagen type I, fibrinogen, von Willebrand factor and surface immobilized platelets at physiological shear rates. **British Journal Haematology**, v. 138, p. 527-533, 2007.

KORTEGEN, A.; HOFMANN, G.; BAUER, M. Sepsis: current aspects of pathophysiology and implications for diagnosis and treatment. **European Journal of Trauma**, v. 32, n. 1, p. 3-9, 2006.

KOVACH, M. A.; STANDIFORD, T. J. The function of neutrophils in sepsis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.25, n.3, p.:321-327, 2012.

KOZIAK, K. et al. Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 82, n. 5, p. 1538-44, 1999.

LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, p. 463-484, 2001.

LANGSTON, H. P. et al. Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. **The Journal of Immunology**, v. 170, p. 2962-2970, 2003.

LEAL, D. B. R. et al. HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1746, p. 129-134, 2005.

LEVY, M. M. et al. For the International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Critical Care Medicine**, v. 31, p. 1250-56, 2003.

MARIK, P. E. early management of severe sepsis. Concepts and controversies. **Chest**, v.145, n.6, p.1407-1418, 2014.

MACDOLNAD, J.; GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. R. oxidative stress and gene expression in sepsis. **British Journal of Anaesthesia**, v.90, p.221-232, 2003

MARTIN, G. S. et al. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1546-54, 2003.

MAK, J. C. Pathogenesis of COPD. Part II. Oxidative-antioxidative imbalance. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.12, n.4, p.368-74, 2008.

MEI, L. et al. Purinergic signaling: a novel mechanism in immune surveillance. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.31, p.1149–1153, 2010.

MORENO, R. P.; MARTIN, G. S. Sepsis without borders. **Intensive Care Medicine**, v.40, p.272-274, 2014.

MUGUERCIA, H. L; PÉREZ, D. L. Estrés Oxidativo y Sepsis. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédica**, Ciudad de la Habana, v. 19, n. 3, 2000.

MUTLAK, H. et al. Cecum ligation and dissection: a novel modified mouse sepsis model. **Journal of Surgical Research**, v.183, n.1, p.321-329, 2013.

NATHAN, C.; CUNNINGHAM-BUSSEL, A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. **Nature Reviews Immunology**, v.13, p.349-361.

NEMZEK, J. A.; HUGUNIN, K. M. S.; OPP, M. R. Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being. **Comparative Medicine**, v.58, n.2, p.120-128, 2008.

OKTYABRSKY, O. N.; SMIRNOVA G. V. Redox regulation of cellular functions. **Biochemistry (Mosc)**, v.72, n.2, p.132-45, 2007.

OPAL, S. M. The host response to endotoxin, antilipoplysaccharide strategies, and the management of severe sepsis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, n. 5, p. 365-377, 2007.

RABELLO, L. S. C. F. et al. Entendo o conceito PIRO: da teoria à prática clínica- parte 1. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 21, n. 4, p. 425-431, 2009.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptores for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, v. 50, p. 413-492, 1998.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. **Drug News & Perspectives**, v. 16, p. 133-140, 2003.

RANGEL FRAUSTO, M. S. Sepsis: still going strong. **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 672-681, 2005.

RITTER, C. et al. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. **Intensive Care Medicine**, v.29, p.1782-1789, 2003.

RITTIRSCH, D.; HOESEL, L. M.; WARD, P. A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, p. 137-143, 2007.

RITTIRSCH, D.; FLIERL, M. A.; WARD, P. A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 776-787, 2008.

RITTIRSCH, D. et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature protocols**, v. 4, n. 1, p. 31-36, 2009.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2; p. 409-430, 2006.

RUSSEL, J. A. Management of sepsis. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 16, p. 1699-1713, 2006.

SALES JR, J. A. et al. Sepse Brasil: Estudo epidemiológico da sepse em unidades de terapia intensiva brasileiras. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 18, n. 1, p. 9-17, 2006.

SALVEMINI, D.; CUZZOCREA, S. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.33, p.1173-1185, 2002

SAREILA, O. et al. NOX2 complex-derived ROS as immune regulators. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.15, n.8, p.2197-2208, 2011.

SCHEIERMANN, P. et al. Cecal ligation and incision: an acute onset model of severe sepsis in rats. **Journal of Surgical Research**, v.151, p.132-137, 2009.

SCHENK, U. et al. Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. **Science Signaling**, v.1, n.39, p.ra6, 2008.

SEOK, J. et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. **PNAS**, v.110, n.9, p.3507-3512, 2013.

SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. **Drug Metabolism Reviews**, v.32, p.307-326, 2000.

SILVA, E. et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**, v.8, n.4, p.R251-R260, 2004.

SORDI, R.; et al. Pneumonia-induced sepsis in mice: temporal study of inflammatory and cardiovascular parameters. **International Journal of Experimental Pathology**, p.1-12, 2013

SOGAYAR, A. M. C. et al. A Multicentre, Prospective Study to Evaluate Costs of Septic Patients in Brazilian Intensive Care Units. **Pharmacoeconomics**, v. 26, n. 5, p. 425-434, 2008.

SOUZA, V.C.G. et al. E-NTPDase and E-ADA activities are altered in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease. **Parasitology International (Print)**, v. 61, p. 690-696, 2012.

STEARNS-KUROSAWA, D.J. et al. The pathogenesis of sepsis. **Annual Review of Pathology Mechanisms of Diseases**, v.6, p.19-48, 2011.

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. **Trends in Biochemical Sciences**, v.30, n.10, p.542-550, 2005.

SUMI, Y. et al. Plasma ATP is required for neutrophil activation in a mouse sepsis model. *Shock*, in press, 2014.

TAMAYO, E. et al. Evolution of neutrophil apoptosis in septic shock survivors and nonsurvivors. **Journal of Critical Care**, v.27, n. 4, p. 415.e1-415.e11, 2012.

TRAUTMANN, A. Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal". **Science Signaling**, v.2, n.56, p.pe6, 2009.

TYML, K. Critical role of oxidative stress, platelets, and coagulation in capillary blood flow impairment in sepsis. **Microcirculation**, v.18, p.152-162, 2011.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p.44-84, 2007.

VAN DER POLL, T; OPAL, S. M. Host–pathogen interactions in sepsis. **The Lancet Infectious Diseases**, v.8, p.32–43, 2008.

VICTOR, V. M.; ROCHA, M.; FUENTE, M. Immune cells: radicals and antioxidants in sepsis. **International Immunology**, v.4, p.327-347, 2004.

VINCENT, J. L. et al. Sepsis definitions: time for change. **Lancet**, v.381, p.774-775, 2013.

VITIELLO, L. et al. Immunoregulation through extracellular nucleotides. **Blood**, v.120, n.3, p.511-518, 2012.

VOELTER, W. et al. Determination of selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine by reverse-phase ion-pair chromatography. **Journal Chromatography**, v. 199, p.345–54, 1980.



WHEELER, D. S. Oxidative stress in critically ill children with sepsis. **Open Inflamm J**, v.4, n.1-M9, p.74-81, 2011.

WEIGHARDT, H., HOLZMANN, B. Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis. **Immunobiology**, v.212, n.9-10, p.715-2, 2007.

WICHTERMAN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal, **Journal of Surgical Research**. v. 29, n. 2, p. 189-201, 1980.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1783, p. 673-694, 2008.

YOUNG, J.D. et al. Purification and characterization of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with natural killer activity. **Cell**, v.44, n.6, p.849-859, 1986.

ZANINI, D. et al . Ectoenzymes and cholinesterase activity and biomarkers of oxidative stress in patients with lung cancer. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 374, p. 137-148, 2013.

ZANOTTI-CAVAZZONI, S. L.; GOLDFARB, R. D. Animal models of sepsis. **Critical Care Clinics**, v.25, p.703-719, 2009.

ZIMMERMANN, H. Nucleotides and CD39: principal modulatory players in haemostasis and thrombosis. **Nature Medicine**. v. 5, n. 9; p. 987-988, 1999.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, p. 299-309, 2000.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, n. 1-2, p. 44-56, 2001.

**ANEXO A- Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética em uso animal**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
*COMITE DE ÉTICA EM USO ANIMAL*  
CEUA - UFSM

---

<b>33/2010</b>	Avaliação da atividade de enzimas que degradam nucleotídeos de adenina e do ferfil oxidativo	Profª Daniela Bitencourt Rosa Leal
----------------	--	---------------------------------------

## ANEXO 2- Artigo publicado no periódico *The Scientific World Journal*

The Scientific World Journal  
Volume 2012, Article ID 941906, 6 pages  
doi:10.1100/2012/941906

The  ScientificWorldJOURNAL

### Research Article

## Increased NTPDase Activity in Lymphocytes during Experimental Sepsis

**Claudia de Mello Bertoncheli,<sup>1</sup> Carine Eloise Prestes Zimmermann,<sup>2</sup> Jeandre Augusto dos Santos Jaques,<sup>2,3</sup> Cláudio Alberto Martins Leal,<sup>3</sup> Jader Betsch Ruchel,<sup>2,3</sup> Bruna Cipolatto Rocha,<sup>2</sup> Kelly de Vargas Pinheiro,<sup>2</sup> Viviane do Carmo Gonçalves Souza,<sup>2</sup> Daniel Roulim Stainki,<sup>2</sup> Sônia Cristina Almeida Luz,<sup>1</sup> Maria Rosa Chitolina Schetinger,<sup>3</sup> and Daniela Bitencourt Rosa Leal<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

<sup>2</sup> Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

<sup>3</sup> Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

Correspondence should be addressed to Daniela Bitencourt Rosa Leal, [dbitencourtrosaleal@gmail.com](mailto:dbitencourtrosaleal@gmail.com)

Received 24 October 2011; Accepted 19 December 2011

Academic Editor: Angelo A. Manfredi

Copyright © 2012 Claudia de Mello Bertoncheli et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

We investigated in rats induced to sepsis the activity of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase; CD39; E.C. 3.6.1.5), an enzyme involved in the modulation of immune responses. After 12 hours of surgery, lymphocytes were isolated from blood and NTPDase activity was determined. It was also performed the histology of kidney, liver, and lung. The results demonstrated an increase in the hydrolysis of adenosine-5'-triphosphate (ATP) ( $P < 0.01$ ), but no changes regarding adenosine-5'-monophosphate (ADP) hydrolysis ( $P > 0.05$ ). Histological analysis showed several morphological changes in the septic group, such as vascular congestion, necrosis, and infiltration of mononuclear cells. It is known that the intracellular milieu contains much more ATP nucleotides than the extracellular. In this context, the increased ATPase activity was probably induced as a dynamic response to clean up the elevated ATP levels resulting from cellular death.

### 1. Introduction

Sepsis is characterized by an inflammatory reaction as a consequence of immune system response to bacterial infection [1, 2]. The immune system has an important role in the pathogenesis of sepsis, which may cause tissue damage and lead to organ failure [3, 4]. The main process involves the activation of inflammatory cells such as leukocytes, tissue macrophages, dendritic cells, and eosinophils [5]. The exacerbated activation of innate immune response is one of the main components involved in the physiopathology of sepsis, which can be identified by increased proinflammatory factors after infection [6].

The membrane bound enzyme ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase; CD39; E.C. 3.6.1.5) modulates adenine nucleotides level, which are fundamental to the modulation of immune responses [7]. The enzymes of this family are widely distributed in animal tissues and represent the main ectoenzyme expressed by endothelial cells and muscle cells of the circulatory system [8, 9]. Under physiological conditions, the nucleotides are present in the extracellular environment in low concentrations, usually nanomolar, but may be found up to micromolar levels [10]. It is known that extracellular ATP, for example, when in micromolar concentrations, can induce the formation of pores in the cell membranes, resulting in osmotic changes [11], and it can also induce two antagonistic effects: cell

proliferation, when in low concentrations, and cell death, when in high concentrations [10].

Considering the involvement of adenine nucleotides hydrolysis in the modulation of immune system and the participation of immune response in sepsis, the purpose of this study was to evaluate the hydrolysis of ATP and ADP in lymphocytes from rats with induced sepsis.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Chemicals.** Adenosine 5'-triphosphate disodium salt (ATP), adenosine 5'-diphosphate sodium salt (ADP), bovine serum albumine, Trizma base, Trypan Blue solution, and Coomassie Brilliant Blue G were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ficoll-Hypaque (Lymphoprep) was purchased from Nycomed Pharma (Oslo, Norway). Physiological solution (0.9 g NaCl/100 mL distilled water) was obtained from Fresenius KABI (Brazil).  $K_2HPO_4$  was purchased from Reagen (Brazil). All chemicals used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

**2.2. Animals.** Male and female Wistar rats of 200–300 g bodyweight were used for all experiments, which were performed in accordance with the guidelines of Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources (UFMS, Brazil) and in accordance with international guidelines.

**2.3. Sepsis Induction and Samples Preparation.** Animals were randomly divided into two groups (5 rats in each group): control and induced sepsis. To induce sepsis, it was used a model of cecal ligation and puncture as previously described [12]. After 12 h of induction, animals were anesthetized with isoflurane and the whole blood was collected through cardiac puncture in tubes containing ethylenediamine tetraacetic acid.

**2.4. Isolation of Mononuclear Cells from Blood.** Lymphocyte-rich mononuclear cells were isolated from blood collected with ethylenediamine tetraacetic acid and separated on Ficoll-Histopaque density [13] as previously described. The percentage of lymphocytes was superior to 93% as previously described [14].

**2.5. NTPDase Activity Assay.** After the isolation of lymphocytes, the NTPDase activity was determined as described previously by our group [15], measuring the amount of liberated inorganic phosphate (Pi) using a colorimetric assay. The reaction medium contained 0.5 mM  $CaCl_2$ , 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 60 mM glucose, and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) in a final volume of 200  $\mu$ L. Then 20  $\mu$ L of intact mononuclear cells suspended in saline solution was added to the reaction medium (2–4  $\mu$ L protein) and preincubated for 10 min at 37°C. The reaction was started by adding the substrate (ATP or ADP) at a final concentration of 2 mM and was stopped with 200  $\mu$ L of 10% trichloroacetic acid to provide a final concentration of 5%. The samples were chilled on ice for 10 min before assaying the release of Pi as described

previously [16], using malachite green as a colorimetric reagent and  $KH_2PO_4$  as a standard. Light absorbance was measured at 630 nm in a spectrophotometer (Biospectro SP-22). Control reactions were performed by adding the enzyme preparation after the addition of trichloroacetic acid to correct for nonenzymatic nucleotide hydrolysis. All samples were run in triplicate, and the specific activity is reported as nanomoles of Pi released per minute per milligram of protein.

**2.6. Protein Determination.** Protein was measured by the Coomassie blue method as described previously [17]. Briefly, a solution of Coomassie (117  $\mu$ L Coomassie, 0.85 M ethyl alcohol, and 1.46 M ortho-phosphoric acid) was prepared. A standard curve with bovine serum albumin varying from 0.1 to 0.5 mg of protein per milliliter was performed. To quantify the protein content, 50  $\mu$ L of sample was added to 2.5 mL of Coomassie solution and, after 5 min, the absorbance was read in a spectrophotometer (Biospectro SP-22) at 595 nm.

**2.7. Anatomopathologic Analysis.** Samples of liver, kidney, and lung tissue, *ex vivo*, were collected and fixed in 10% formalin solution and then dehydrated and embedded in paraffin, followed by sectioning and histological staining with hematoxylin and eosin (H&E). The slides were observed in an optical microscope (400x) to check for possible changes in the respective tissues.

**2.8. Statistical Analysis.** Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney test, since results did not show Gaussian distributions.  $P < 0.05$  was considered to represent a significant difference among the analyses performed. All data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean.

## 3. Results

**3.1. Clinical Features.** After 12 h of sepsis induction, the animals showed swollen abdominal region with fecal material release, as described by Benjamin [18].

**3.2. NTPDase Activity in Lymphocytes.** The statistical analysis demonstrated that animals from septic group had an increased ATP hydrolysis ( $P < 0.01$ ) (Figure 1(a)) but did not show any statistical difference ( $P > 0.05$ ) in regard to ADP hydrolysis (Figure 1(b)).

**3.3. Anatomopathologic Analysis.** Kidney section of control group showed normal (A) glomeruli and convoluted tubules within renal cortex. No abnormal proliferations were seen. The medulla and hilum were microscopically normal. Atypical congested convoluted tubules were seen in kidneys of rats with induced sepsis. In some areas, the convoluted tubules were lined by crowded hyperchromatic cuboidal cells, which had decreased cytoplasm. Kidney sections also showed some congested glomeruli, besides tubular necrosis with multiple points along the nephron with cellular vacuolization (degeneration) and necrosis. Shedding or desquamation of cell

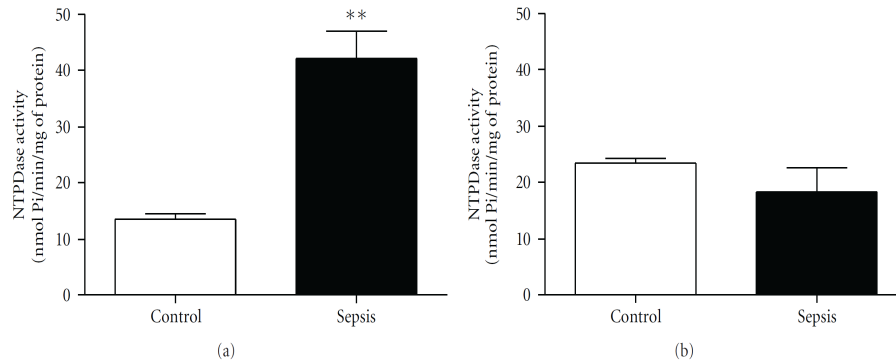


FIGURE 1: NTPDase activity in peripheral blood lymphocytes from rats with induced sepsis using (a) ATP or (b) ADP as a substrate. Bars represent means  $\pm$  standard error of the mean ( $P < 0.01$ ,  $n = 5$ ). Mann-Whitney test. \*\*Indicates a significant difference compared with control.

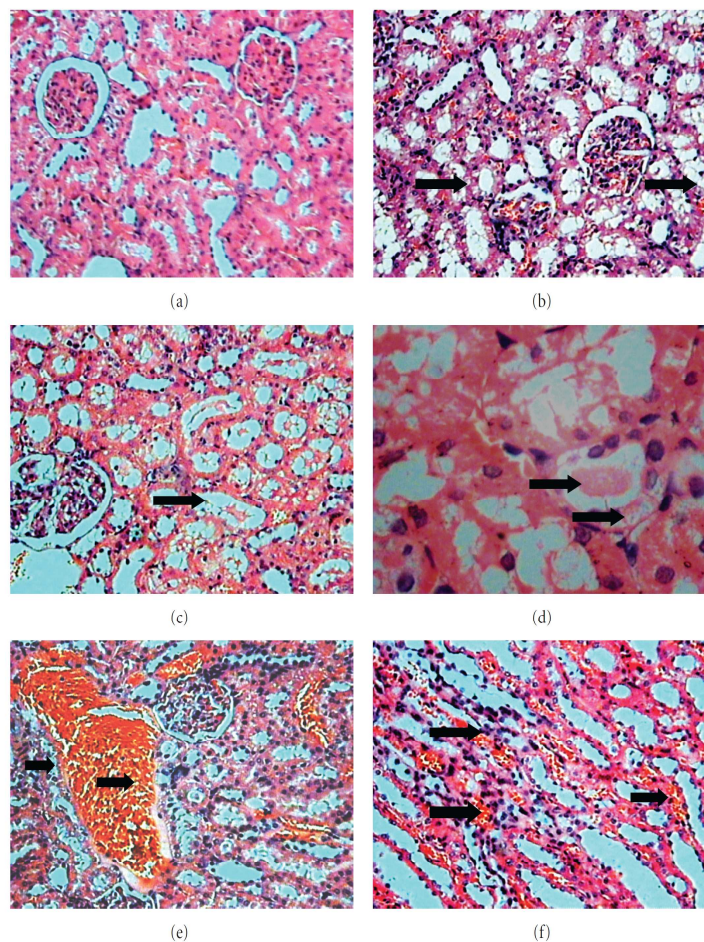


FIGURE 2: (a) Normal architecture of kidney with normal convoluted tubules and glomeruli (HE, 10x). (b) Abnormal kidney of rat with induced sepsis showed architecture with cellular vacuolization (degeneration) (HE, 10x). (c) Congested tubules (HE, 10x). (d) Congested convoluted proximal tubules lined by vacuolar cells with absence of individual tubular cells (HE, 40x). (e) Presence of substantial vascular congestion in capillaries in the cortex and desquamation of cell fragments into lumen (HE, 10x). (f) The medullar area shows congested peritubular capillaries (vasa recta) with discrete polymorphonuclear infiltrate (HE, 10x).

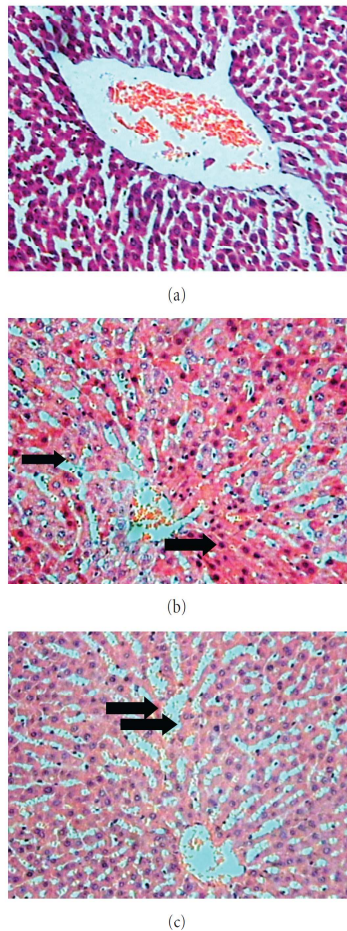


FIGURE 3: (a) Liver sections of control rats showing normal histological appearance (HE, 10x). (b) Liver of the rats with induced sepsis showed a partial hepatic cord disarrangement and an increased number of hepatocytes in process of involution with pyknotic nuclei and condensed cytoplasm (HE, 10x). (c) The central vascular sinusoids are dilated and congested filled with erythrocytes. Periportal hepatocytes are normal (*not showed*) (HE, 10x).

fragments into lumen and absence of individual tubular cells were also viewed. Presence of marked vascular congestion in arterioles and peritubular capillaries in the renal cortex and medullar area were observed (Figure 2). These findings suggest tubular necrosis.

The liver section of control group showed normal histological appearance with normal polyhedral hepatocytes. The rats with induced sepsis showed important morphologic changes, as vascular congestion and some marks of necrosis. The microscopic analysis showed partial hepatic cord disarrangement and increased number of hepatocytes undergoing involution with pyknotic nuclei and condensed cytoplasm. The central veins, spaces of Disse, and central

vascular sinusoids were dilated and congested, filled with erythrocytes (Figure 3).

The lung section of control group showed normal histological appearance showing a bronchiole and adjacent alveoli, airways, blood vessel, and parenchyma with delicate alveolar septal tissues. The rats with induced sepsis different degrees of lung consolidation developed and alveolar spaces were infiltrated with a large number of mononuclear cells (Figure 4).

#### 4. Discussion

The extracellular nucleotides are important signaling molecules, being essential to start and maintain the inflammatory reactions [19]. These nucleotides are found in high concentrations within cells when compared to the extracellular environment, which is a characteristic of signaling molecules. Thus, in response to different stimulus or conditions, including damage to plasmatic membrane induced by hypoxia, ischemia, or inflammation, increasing concentrations of nucleotides can be released to the extracellular environment [20]. During the inflammatory process, ATP is involved in the development of inflammation by several processes: released histamine from mastocytes, production of prostaglandins, and production and release of cytokines from immune cells [21]. Besides these release forms, related mainly to cellular injury, ATP may be released from intact cells by physiological mechanisms, as it occurs, for example, in nervous transmission.

In this study, histological analysis showed several morphological changes in organs analyzed from septic group in tissues such as kidney, liver, and lung. Among the more outstanding changes include the marked vascular congestion, necrosis, and infiltration of mononuclear cells in agreement with previous studies [22] in lung tissue.

Furthermore, the results also demonstrated that the animals induced to sepsis had an increase in the NTPDase activity (ATP as a substrate) and no alterations in the ADP hydrolysis. The increased NTPDase activity in lymphocytes and the morphological alterations observed in the septic group are probably related with a physiological increase of ATP in the extracellular milieu. A physiological role for ATP is the regulation of inflammation [23], and it is known that once released, it interacts with specific receptors, denominated purinergic receptors, which establish a communication between cells [24]. The action of ATP during the inflammatory process occurs primarily via activation of purinergic P2X receptors, which may lead the cellular apoptosis [25]. Extracellular ATP has been shown to induce shedding of L-selectin from T lymphocytes via activation of purinergic P2X7 receptors [26–30]. Since L-selectin is primarily involved in lymphocyte homing to lymphoid tissues and is shed upon lymphocyte activation, ATP was proposed to be involved in migration of activated lymphocytes to sites of inflammation [31]. Additionally, there was verified [32] a possible involvement of P2X7 receptors in the lymphocytes proliferation and the activation of interleukin-2 transcription factor as a consequence. Interleukin-2 is a proinflammatory cytokine as interleukin-6, tumor necrosis factor- $\alpha$ ,

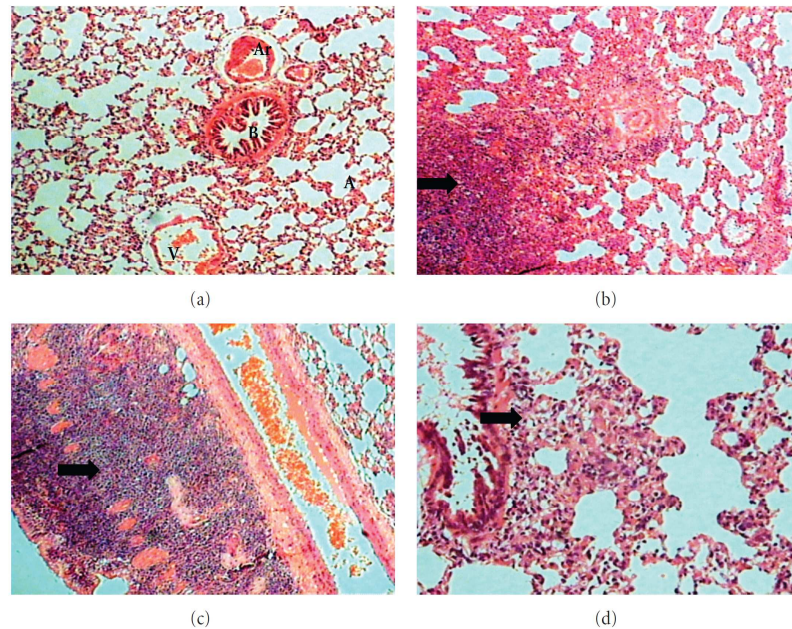


FIGURE 4: (a) Lung section of control group with normal histological appearance of alveolus (A), bronchiole (B), arteriole (Ar) and venule (V) (HE, 10X). (b) Lung of rats with induced sepsis showing different degrees of lung consolidation and alveolar spaces were infiltrated with a large number of mononuclear cells (HE, 10x). (c) Presence of mononuclear infiltrated in the wall of bronchiole (HE, 10x). (d) Local thickening of infiltrated mononuclear cells in alveolar wall and peribronchial area (HE, 20x).

and interferon- $\gamma$  [1], which participate in the inflammatory response regulation in sepsis [33]. These results corroborate with our findings, which suggest an increased extracellular ATP level in the animals induced to sepsis.

It is proposed that the systemic injuries promoted by this induced clinical condition may have increased the extracellular levels of ATP as a consequence of the cellular damage observed. In this context, the increased ATPase activity was probably induced as a dynamic response to clean up the elevated ATP levels resulting from cellular death.

### Conflict of Interests

There is no actual or potential conflict of interest.

### Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

### References

- [1] R. C. Bone, C. J. Grodzin, and R. A. Balk, "Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process," *Chest*, vol. 112, no. 1, pp. 235–243, 1997.
- [2] D. M. Vandijck, J. M. Decruyenaere, and S. I. Blot, "The value of sepsis definitions in daily ICU-practice," *Acta Clinica Belgica*, vol. 61, no. 5, pp. 220–226, 2006.
- [3] M. Holub and C. F. Benjamin, "Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse," *Medicina*, vol. 34, pp. 18–26, 2001.
- [4] M. S. Rangel-Frausto, "Sepsis: still going strong," *Archives of Medical Research*, vol. 36, no. 6, pp. 672–681, 2005.
- [5] E. D. Crouser, "Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome," *Mitochondrion*, vol. 4, no. 5-6, pp. 729–741, 2004.
- [6] C. A. Mastrorandi, V. Srivastava, W. H. Yu, W. L. Dees, and S. M. McCann, "Lipopolysaccharide-induced leptin synthesis and release are differentially controlled by alpha-melanocyte-stimulating hormone," *NeuroImmunoModulation*, vol. 12, no. 3, pp. 182–188, 2005.
- [7] S. C. Robson, J. Sévigny, and H. Zimmermann, "The E-NTP Dase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance," *Purinergic Signaling*, vol. 2, no. 2, pp. 409–430, 2006.
- [8] R. B. Gayle III, C. R. Maliszewski, S. D. Gimpel et al., "Inhibition of platelet function by recombinant soluble Ecto-ADPase/CD39," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 101, no. 9, pp. 1851–1859, 1998.
- [9] M. R. C. Schetinger, V. L. P. Vieira, V. M. Morsch, and D. Balz, "ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes," *Comparative Biochemistry and Physiology B*, vol. 128, no. 4, pp. 731–741, 2001.
- [10] F. Di Virgilio, P. Chiozzi, D. Ferrari et al., "Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells," *Blood*, vol. 97, no. 3, pp. 587–600, 2001.

- [11] A. Surprenant, F. Rassendren, E. Kawashima, R. A. North, and G. Buell, "The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7)," *Science*, vol. 272, no. 5262, pp. 735–738, 1996.
- [12] D. Rittirsch, M. S. Huber-Lang, M. A. Flierl, and P. A. Ward, "Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture," *Nature Protocols*, vol. 4, no. 1, pp. 31–36, 2009.
- [13] A. Böyum, "Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g," *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, vol. 97, supplement, pp. 77–89, 1968.
- [14] J. A. D. S. Jaques, J. F. Peres Rezer, J. B. Ruchel et al., "A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity," *Analytical Biochemistry*, vol. 410, no. 1, pp. 34–39, 2011.
- [15] D. B. R. Leal, C. A. Streher, T. N. Neu et al., "Characterization of NTPDase (NTPDase1; Ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1721, no. 1-3, pp. 9–15, 2005.
- [16] K. M. Chan, D. Delfert, and K. D. Junger, "A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity," *Analytical Biochemistry*, vol. 157, no. 2, pp. 375–380, 1986.
- [17] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1-2, pp. 248–254, 1976.
- [18] C. F. Benjamin, "Present understanding of mediators and experimental models of sepsis," *Medicina*, vol. 34, pp. 18–26, 2001.
- [19] D. T. Luttkhuizen, M. C. Harmsen, L. F. M. H. De Leij, and M. J. A. Van Luyn, "Expression of P2 receptors at sites of chronic inflammation," *Cell and Tissue Research*, vol. 317, no. 3, pp. 289–298, 2004.
- [20] H. Zimmermann, "Nucleotides and cd39: principal modulatory players in hemostasis and thrombosis," *Nature Medicine*, vol. 5, no. 9, pp. 987–988, 1999.
- [21] F. D. Virgilio, "Purinergic P2X7 receptor: a pivotal role in inflammation and immunomodulation," *Drug Development Research*, vol. 45, no. 3-4, pp. 207–213, 1998.
- [22] A. D'Acampora, J. Bernhardt, J. Serafim, D. Farias, and R. Tramonte, "Efeitos da castração pós-natal sobre o tecido pulmonar após sepse experimental de origem abdominal em ratos," *Acta Cirúrgica Brasileira*, vol. 19, pp. 115–119, 2004.
- [23] J. A. D. S. Jaques, J. F. P. Rezer, J. B. Ruchel et al., "Lung and blood lymphocytes NTPDase and acetylcholinesterase activity in cigarette smoke-exposed rats treated with curcumin," *Biomedicine and Preventive Nutrition*, vol. 1, no. 2, pp. 109–115, 2011.
- [24] G. Burnstock, "Introduction: P2 receptors," *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 4, no. 8, pp. 793–803, 2004.
- [25] E. Bulanova, V. Budagian, Z. Orinska et al., "Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X7 receptor in murine mast cells," *Journal of Immunology*, vol. 174, no. 7, pp. 3880–3890, 2005.
- [26] J. I. Elliott and C. F. Higgins, "Major histocompatibility complex class I shedding and programmed cell death stimulated through the proinflammatory P2X7 receptor: a candidate susceptibility gene for NOD diabetes," *Diabetes*, vol. 53, no. 8, pp. 2012–2017, 2004.
- [27] B. J. Gu, W. Y. Zhang, L. J. Bendall, I. P. Chessell, G. N. Buell, and J. S. Wiley, "Expression of P2X7 purinoceptors on human lymphocytes and monocytes: evidence for nonfunctional P2X7 receptors," *American Journal of Physiology*, vol. 279, no. 4, pp. C1189–C1197, 2000.
- [28] G. P. Jamieson, M. B. Snook, P. J. Thurlow, and J. S. Wiley, "Extracellular ATP causes loss of L-selectin from human lymphocytes via occupancy of P2Z purinoceptors," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 166, no. 3, pp. 637–642, 1996.
- [29] J. M. Labasi, N. Petrushova, C. Donovan et al., "Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response," *Journal of Immunology*, vol. 168, no. 12, pp. 6436–6445, 2002.
- [30] M. Seman, S. Adriouch, F. Scheuplein et al., "NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor," *Immunity*, vol. 19, no. 4, pp. 571–582, 2003.
- [31] M. J. L. Bours, E. L. R. Swennen, F. Di Virgilio, B. N. Cronstein, and P. C. Dagnelie, "Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 112, no. 2, pp. 358–404, 2006.
- [32] V. Budagian, E. Bulanova, L. Brovko et al., "Signaling through P2X7 receptor in human T cells involves p56lck MAP kinases, and transcription factors AP-1 and NF- $\kappa$ B," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 3, pp. 1549–1560, 2003.
- [33] A. Hillenbrand, U. Knappschild, M. Weiss et al., "Sepsis induced changes of adipokines and cytokines—septic patients compared to morbidly obese patients," *BMC Surgery*, vol. 10, article no. 26, 2010.