

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**ANÁLISE DE ELEMENTOS DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA
EM PACIENTE SÉPTICOS**

Rafael Olivé Leite

Pelotas, 2016

Rafael Olivé Leite

**ANÁLISE DE ELEMENTOS DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA
EM PACIENTE SÉPTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Profa. Dra Elizandra Braganhol.

Pelotas, 2016

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

L533a Leite, Rafael Olivé
Análise de elementos da sinalização purinérgica em
pacientes sépticos / Rafael Olivé Leite. – 70f. : il. – Dissertação
(Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e
Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas. Centro de
Ciências Químicas, Farmacêuticas e da Alimentação , 2017. –
Orientadora Elizandra Braganhol.

1.Bioquímica. 2.Sepse. 3.Neutrófilo. 4.ATP.
5.Ectonucleotidases. 6.Sinalização purinérgica. I.Braganhol,
Elizandra. II.Título.

CDD: 573.154

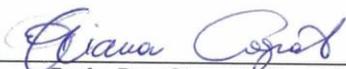
Dissertação aprovada como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 20 de Dezembro de 2016

Banca examinadora:



Profa. Dra. Elizandra Braganhol (Orientador)
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
Professora Adjunta, PPG Bioquímica e Bioprospecção, UFPEL



Profa. Dra. Giana de Paula Cognato
Doutora em Ciências Biológicas (Química) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Professora Adjunta, PPG Bioquímica e Bioprospecção, UFPEL



Profá. Dra. Maria Cristina Gonzalez
Doutora em Epidemiologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).
Professora Titular, PPG Saúde e Comportamento, UCPEL

Aos pacientes

Agradecimentos

*a Deus, por me fazer instrumento de
coisas boas,
a meus pais, que me deram
asas, e raízes,
a Andréa, por uma vida toda de
amor e beleza,
a Sofia e Artur, por darem
sentido a tudo.*

No início me senti um "estranho no ninho". Um pouco mais velho, sem intimidade com laboratório, sem tempo, sem conhecer ninguém. Logo fui aprendendo a ficar a vontade, e a admirar as pessoas do PPG Bioquímica e Bioprospecção, competentes, engajadas, de bom convívio, que resolvem. Agradeço a todos, são muitos, colegas pós-graduandos, professores, pessoas por quem passei tão rapidamente mas que foram parceiros nesta "correria".

Entre eles, quero destacar os professores e alunos dos laboratórios daqui do PPG e da UFCSPA que se envolveram em nosso projeto. Senti-me alvo de sua generosidade e sou admirador de sua competência.

Os agradecimentos especiais são para a Elizandra, pela sabedoria em plantar e deixar crescer. E para o Fernando, pela confiança e engajamento.

Às vezes as pessoas dizem que outros lhes dão bons exemplos a seguir e também maus exemplos, a evitar. Sou grato porque, nesta experiência, encontrei apenas o primeiro caso.

Resumo

LEITE, Rafael Olive. **Análise de Elementos da Sinalização Purinérgica em Pacientes Sépticos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção)- Programa de Pós- Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

Objetivo: A inter-relação entre sinalização purinérgica e sepse está amplamente documentada na pesquisa pré-clínica. Nós especulamos que alterações na sinalização purinérgica também estariam presentes na sepse em humanos.

Metodos: A expressão em RNAm de receptores purinérgicos em neutrófilos circulantes, concentração sérica de ATP sérico e atividade sérica de nucleotidases foram medidos em um grupo de pacientes sépticos internados na UTI, pacientes não-sépticos internados em enfermarias e um grupo de voluntários saudáveis.

Resultados: Os pacientes sépticos (n=10) tinham idade média de 59,9 (23 - 80) anos, score SOFA de 7,6 (4 - 11) pontos. Pacientes não sépticos da enfermaria (n=10) tinham idade média de 70,5 (60 - 91) anos. Ambos os grupos tinham comorbidades com o hipertensão arterial, diabetes e câncer. Os neutrófilos de pacientes sépticos tinham uma expressão 6 a 7 vezes maior dos receptores P2Y2 e A2a a nível de RNAm, quando comparado aos controles. Os níveis séricos de ATP e a atividade de nucleotidase estavam significativamente aumentadas em pacientes sépticos quando comparados aos controles.

Conclusão: Nós demonstramos a atividade de elementos de sinalização purinérgica em pacientes sépticos na UTI. Somando-se a evidências anteriores, nossos achados sugerem que o ATP, seus receptores e as nucleotidases são atores no desenvolvimento da sepse. A sinalização purinérgica, em especial a *ATPérgica*, fornece uma estrutura para o desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas a sepse.

Palavras-chave: Sepse. Neutrófilos. ATP. Nucleotidases. Sinalização Purinérgica.

Abstract

LEITE, Rafael Olive. **Purinergic Signaling Elements Analysis in Septic Patients** 2016. Dissertation (Masters degree in Biochemistry and Bioprospection) - Graduate Program in Biochemistry and Bioprospection, Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

Purpose: Purinergic signaling interplays with sepsis pathophysiology is widely documented in pre-clinical research. We speculated that alterations in purinergic signaling are also present in human sepsis.

Methods: Purinergic receptor mRNA expression in circulating neutrophils, serum ATP and serum nucleotidase activity was measured in a group of septic ICU patients, non-septic ward patients and healthy volunteers.

Results: Septic ICU patients (n=10) had mean age of 59,9 (23 - 80) years, SOFA score of 7,6 (4 - 11) points. Ward non-septic patients (n=10) had mean age of 70,5 (60 - 91) years Both groups had comorbidities like hypertension, diabetes or cancer. Neutrophils from septic patients neutrophils expressed 6 to 7 times more P2Y2 and A2a receptors mRNA level when compared to healthy volunteers (n=10) and non-septic ward patients. Serum ATP levels and nucleotidase activity was significantly elevated in septic patients when compared to controls.

Conclusion: We demonstrated purinergic signaling elements to be active in septic ICU patients. Adding to previous evidences, our findings suggest ATP, its receptors and nucleotidases are major players in sepsis development. Purinergic signaling, specially ATPergic signaling, provides a framework to develop diagnosis and therapeutic strategies in sepsis.

Keywords: Sepsis. Neutrophils. ATP. Nucleotidases. Purinergic Signaling.

Lista de Figuras

Figura 1: Teorias da inflamação na sepse	pg. 19.
Figura 2: Resposta inflamatória na sepse	pg. 21.
Figura 3: Elementos da sinalização purinérgica	pg. 28.
Figura 4: Sinalização purinérgica em células imunes	pg. 30.
Figura 5: Modelo de sinalização autócrina	pg. 32.
Figura 6: Modelo de sinalização parácrina	pg. 33.

Sumário

Parte I

Resumo	06
Abstract	07
Lista de Figuras	08

Parte II

1. Introdução	11
2. Objetivos	12
3. Revisão da Literatura	13
Sepse	13
A definição de sepse	13
Relevância	16
3.1.3. Fisiopatologia	18
3.1.4 A pesquisa em sepse	26
Sistema de sinalização purinérgica	28
Sepse e sinalização purinérgica	31
3.3.1, Imunidade Inata	32
3.3.2. Imunidade Adquirida	35
3.3.3 Descrição em humanos	36

Parte II

4. Manuscrito	38
5. Conclusão	61
6. Submissão	62
7. Referências	63

Parte II

1. Introdução

Especula-se que a sepse afete mais de 30 milhões de pessoas e seja responsável por 10 milhões de óbitos no mundo, anualmente, o que a torna um dos grandes temas da saúde pública. As taxas de mortalidade variam muito entre os países, refletindo o fato de que os melhores resultados são obtidos com utilização intensiva de recursos humanos e materiais, em um complexo processo de cuidado multidisciplinar. (VINCENT, 2014, FLEISCHMAN 2016)

O conceito de sepse vem sendo construído através da história da Medicina, com as primeiras menções a este diagnóstico remontando a milhares de anos atrás. Recentemente, a sepse foi definida como “uma disfunção orgânica ameaçadora da vida, causada por uma resposta inflamatória desregulada, em resposta a uma infecção”, enfatizando a presença do componente inflamatório distinguindo a sepse da infecção não-complicada. (SINGER, 2016)

O tratamento da sepse consiste em reduzir a carga de patógenos com antibióticos ou cirurgia quando for o caso, e suporte às disfunções orgânicas em ambiente de tratamento intensivo. Com relação ao componente inflamatório, que acredita-se ser a causa das disfunções orgânicas e óbitos, mais de 100 ensaios clínicos em mais de 30 anos de pesquisa não lograram um único tratamento aprovado para uso. (MARSHALL, 2014)

O sistema de sinalização purinérgica, formados por receptores P1, para o nucleosídeo adenosina e P2, que tem como agonistas os nucleotídeos ATP, UTP, ADP e UDP, tem sido relacionado à fisiopatologia da sepse por um numeroso conjunto de evidências pré-clínicas.

A hipótese desta pesquisa é de que a transcrição de receptores purinérgicos, a concentração sérica de ATP e a atividade sérica de nucleotidase estão alterados em pacientes sépticos quando comparados com pacientes não-sépticos e controles saudáveis.

2. Objetivos

Objetivo geral:

Testar a hipótese de que existe associação entre atividade do sistema de sinalização purinérgica com o diagnóstico da sepse grave/choque séptico em humanos.

Objetivos específicos

1. Avaliar em pacientes portadores de sepse grave/choque séptico e em pacientes que não são portadores deste diagnóstico:

- A intensidade da transcrição de receptores P2X7, P2Y2, P2Y6 e A2a.
- A concentração sérica de ATP
- A atividade de nucleotidasés séricas.
- A mortalidade dos pacientes sépticos em 28 dias.
- A presença e a intensidade das lesões orgânicas através do score clínico SOFA.

2. Analisar estatisticamente as medidas acima descritas, medindo a diferença entre os três grupos de pacientes através de ANOVA com post-hoc de Tukey para as variáveis paramétricas e Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para as não-paramétricas.

3. Revisão de literatura

Sepse

Sobre os ombros de gigantes: a definição de sepsé

NOTAE VERA INFLAMMATIONIS SUNT QUATTUOR; RUBOR ET TUMOR CUM CALORE ET DOLORE

A palavra sepsé deriva do grego “σηψιζ”, que significa a decomposição de matéria orgânica. Seu primeiro uso no contexto médico remonta aos poemas de Homero, possivelmente entre 800 e 1.100 A.C. Mais distante, o primeiro relato conhecido de um tratamento para uma doença febril aparece em um tratado de um imperador chinês em 2.375 A.C. (FUNK, 2009)

Hipócrates, cerca de 400 A.C, definia sepsé como a disrupção de tecidos do corpo, que era mal-cheirosa e podia ser letal. Seu contrário era a *pepsi*, um processo benigno de transformação dos tecidos, análogo a digestão e a fermentação. Hipócrates ainda especulava que a doença poderia ter início no intestino grosso e dali seriam liberadas substâncias perigosas, capazes de intoxicar o paciente. (MARSHALL, 2009)

O médico romano Galeno (150 A.C.), agudo observador das patologias humanas, descreveu a drenagem dos abscessos e o processo de cicatrização espontânea. Ainda a séculos da hipótese microbiana, Galeno conferia à formação de pus uma propriedade que induziria a cura da ferida. Suas observações não foram questionadas por 15 séculos, até o renascimento, por Leonardo da Vinci e pelo anatomista Andreas Vesalius. (FUNK, 2009)

Devemos a Galeno e Paracelso a primeira descrição da inflamação, do latim *inflammatio*¹ (atear fogo): um processo *curativo*, caracterizado por dor, calor, rubor, e tumor (inchaço) do local da ferida. Um quinto sinal, importantíssimo, é a disfunção do órgão. Este conceito é vigente, depois de quase 2000 anos. (VINCENT, 2013)

É interessante que os romanos, seguindo o pensamento grego, também especulavam que das fossas, do esgoto sanitário, vinham seres invisíveis capazes de causar doenças, daí sua preocupação com o saneamento. Mas,

¹inflammation. (n.d.). Online Etymology Dictionary. Retrieved November 22, 2016 from Dictionary.com website <http://www.dictionary.com/browse/inflammation>

naquele ponto, entre os médicos, vigia a teoria da geração espontânea destes seres, os germes, o que preveniu maiores avanços no combate às doenças infecto-contagiosas por quase dois milênios.

A prova de que os seres microscópicos não eram gerados espontaneamente em tecidos putrefatos veio no século XVII, em um experimento de Francisco Redi em 1684, testando a teoria publicada por Fracastorius em 1546, de que a putrefação se devia a ação de minúsculos seres capazes de se multiplicar e contagiar outros tecidos. Contudo, a ciência só pode comprovar a teoria do germe com a construção do microscópio, e seres microscópicos passaram a ser descritos nos séculos XVII e XVIII através de microscópios rudimentares.

Finalmente, coube a Lister, Semmelweiss, Pasteur e Koch, já no século XIX, a grande revolução de comprovar a teoria da etiologia microbiana da sepse e das infecções em geral. (LISTER, 1867) (KOCH, 1882)

Inflamação causada pela atuação de germes, uma doença potencialmente letal. Assim o conceito de sepse chega ao século XX, enfatizando a origem microbiana e o papel ambivalente da inflamação.

A necessidade de critérios diagnóstico objetivos, que pudessem identificar mais especificamente a população de pacientes sépticos ingressantes em ensaios clínicos levou às definições atuais.

Em 1987, Roger Bone testou a hipótese de que reduzir a inflamação com anti-inflamatórios esteróides poderia reduzir o componente inflamatório da sepse, com benefícios para os pacientes. O fracasso da proposta de tratamento com metilprednisolona, uma das primeiras tentativas de modular o processo inflamatório na sepse, não impediu a formação de consenso ao redor da idéia de que a sepse é causada por uma inflamação resultante de uma infecção. (BONE, 1987)

Desta forma, os critérios diagnósticos utilizados naquela pesquisa basearam, em 1991, o primeiro consenso internacional sobre o diagnóstico de sepse. Ficaram definidas quatro categorias nosológicas no espectro da sepse: (BONE, 1992)

- A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), caracterizada por sinais clínicos e laboratoriais de inflamação, e que poderia ser estéril, ou seja, de etiologia não-infecciosa.

- A sepse, uma SRIS na presença de infecção (confirmada ou presumida).

- A sepse grave, uma sepse associada a disfunção orgânica, ou seja, insuficiência respiratória, renal etc.

- O choque séptico, quando a falência em questão é do sistema cardiovascular, caracterizada por hipotensão arterial persistente após uma reposição volêmica adequada.

Tal definição foi revista no início da década passada, onde, numa tentativa de aumentar a especificidade do diagnóstico, foram incluídos marcadores inflamatórios como proteína C-reativa e procalcitonina, e também foram melhor delimitadas as falências orgânicas exigidas para o diagnóstico de sepse grave. (LEVY, 2001)

A preocupação com a pouca acurácia dos critérios diagnósticos, que poderiam levar a internações desnecessárias, levaram a mais uma revisão, mais profunda, publicada por um painel de especialistas das sociedades americana e europeia de medicina intensiva no início de 2016, chamada SEPSIS-3. (SINGER, 2016)

Segundo a SEPSIS-3, sepse é uma “disfunção orgânica ameaçadora à vida, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção”. Foram excluídos da definição os diagnósticos de sepse grave e SRIS e mantidos os diagnósticos de sepse (definido acima) e choque séptico, que é definido como "um sub-tipo de sepse com marcada disfunção circulatória, celular e metabólica, e que pode ser identificado em um paciente com sepse e necessidade de vasopressores para manter uma pressão arterial média acima de 65 mmHg e hiperlactatemia, na ausência de hipovolemia."(SINGER, 2016)

A evolução da sepse como entidade nosológica nas últimas décadas confunde-se com a necessidade de ao mesmo tempo apresentar uma certa

uniformidade diagnóstica, para conduzir pesquisas e levantamentos epidemiológicos com grupos mais homogêneos, mas também com uma tentativa de validar o diagnóstico pelo desfecho. Neste sentido, o SEPSIS-3 propõe critérios diagnósticos simplificados, derivados de um banco de dados com mais de um milhão de avaliações clínicas, que com uma acurácia razoável podem apontar um desfecho de morte ou internação prolongada na unidade de tratamento intensivo (UTI).

Não obstante, diversas entidades internacionais não ratificaram o SEPSIS-3 na sua integralidade, inclusive o Instituto Latino-Americano de Sepse (ILAS), entidade que congrega médicos e pesquisadores nacionais, que não recomenda a adoção dos novos critérios diagnósticos. A crítica mais frequente é a da menor sensibilidade para o diagnóstico, o que poderia, em um ambiente de menor acesso ao atendimento, deixar pacientes sem tratamento intensivo.

É importante ressaltar, desde já, que os pacientes sépticos recrutados nesta pesquisa o foram ainda sob as definições anteriores, mas em todos os casos o diagnóstico manteve-se pelos critérios do SEPSIS-3.

Relevância

A sepse é uma doença extremamente relevante para a saúde pública em todo o mundo. A incidência anual foi recentemente estimada, nos países desenvolvidos, em uma taxa de 237 casos /100.000 habitantes / ano. Infelizmente, são raros os estudos que avaliam a incidência da sepse em populações de países em desenvolvimento. No Brasil não dispomos destes dados, mas em uma extrapolação da incidência reportada nos países desenvolvidos chegamos a uma taxa que supera os 490.000 casos anuais. Utilizando o mesmo raciocínio para a população global, chegamos a 31 milhões de casos anuais. (VINCENT, 2014, FLEISCHMAN 2016)

Os custos associados ao tratamento da sepse foram estimados, nos Estados Unidos, em cifras que superam 20 bilhões de dólares anuais. No Brasil, uma estimativa do ILAS em 2004 situou o custo do tratamento de cada

caso de sepse em cerca de 10.000 dólares. Considerando uma incidência anual de 490.000 casos, uma estimativa grosseira aponta para um custo anual de tratamento de sepse, no Brasil, na faixa de 4,9 bilhões de dólares. (SOGAYAR, 2008)

Estas estimativas referem-se aos custos hospitalares, sem menção aos custos indiretos, de perda de capacidade laboral e do cuidado com o sobrevivente, que em grande proporção tem dificuldade para retomar uma vida autônoma, livre de cuidados especiais.

A mortalidade relacionada à sepse foi recentemente estimada em uma coorte global que incluiu mais de 10.000 pacientes, de 730 UTIs em 84 países. Observou-se uma mortalidade global de 35% nos casos de sepse, mas com marcadas diferenças entre os países. (VINCENT, 2014)

O estudo SPREAD², de iniciativa do ILAS, pesquisou o impacto da sepse em 229 UTIs brasileiras, aleatoriamente selecionadas entre as 1.813 unidades cadastradas no Censo Brasileiro de UTIs, da Associação da Medicina Intensiva Brasileira. Análise preliminar dos dados revela que no dia do estudo um terço dos leitos de tratamento intensivo do Brasil estavam ocupados com pacientes vítimas de sepse e choque séptico. Esta população apresentou uma taxa de mortalidade entre 57% e 70%, de acordo com a região estudada.

É importante ressaltar que os estudos acima foram realizados sob as definições antigas de sepse, mais sensíveis, que nas regiões do mundo com mais acesso aos leitos de UTI tendiam a alocar pacientes menos graves, e portanto com menor mortalidade.

As diferenças encontradas entre as taxas brasileiras e as observadas nos países desenvolvidos explicam-se em parte pela dificuldade de acesso aos leitos de UTI pela população que depende do SUS, e pelo desconhecimento de elementos do diagnóstico e tratamento da sepse pelos profissionais da saúde e pela população brasileira em geral. (ASSUNÇÃO, 2010)

² *in press*, disponível no site do ILAS, consultado em <http://www.ilas.org.br/spread.php> 26/11/16 às 18h40

Pode-se sintetizar o impacto global da sepse como o de uma doença que atinge cerca de 30 milhões de pessoas no mundo a cada ano, e que pode ser responsável por mais de 10 milhões de óbitos anuais, com altíssimo custo de tratamento, e grande impacto na sociedade.

Fisiopatologia

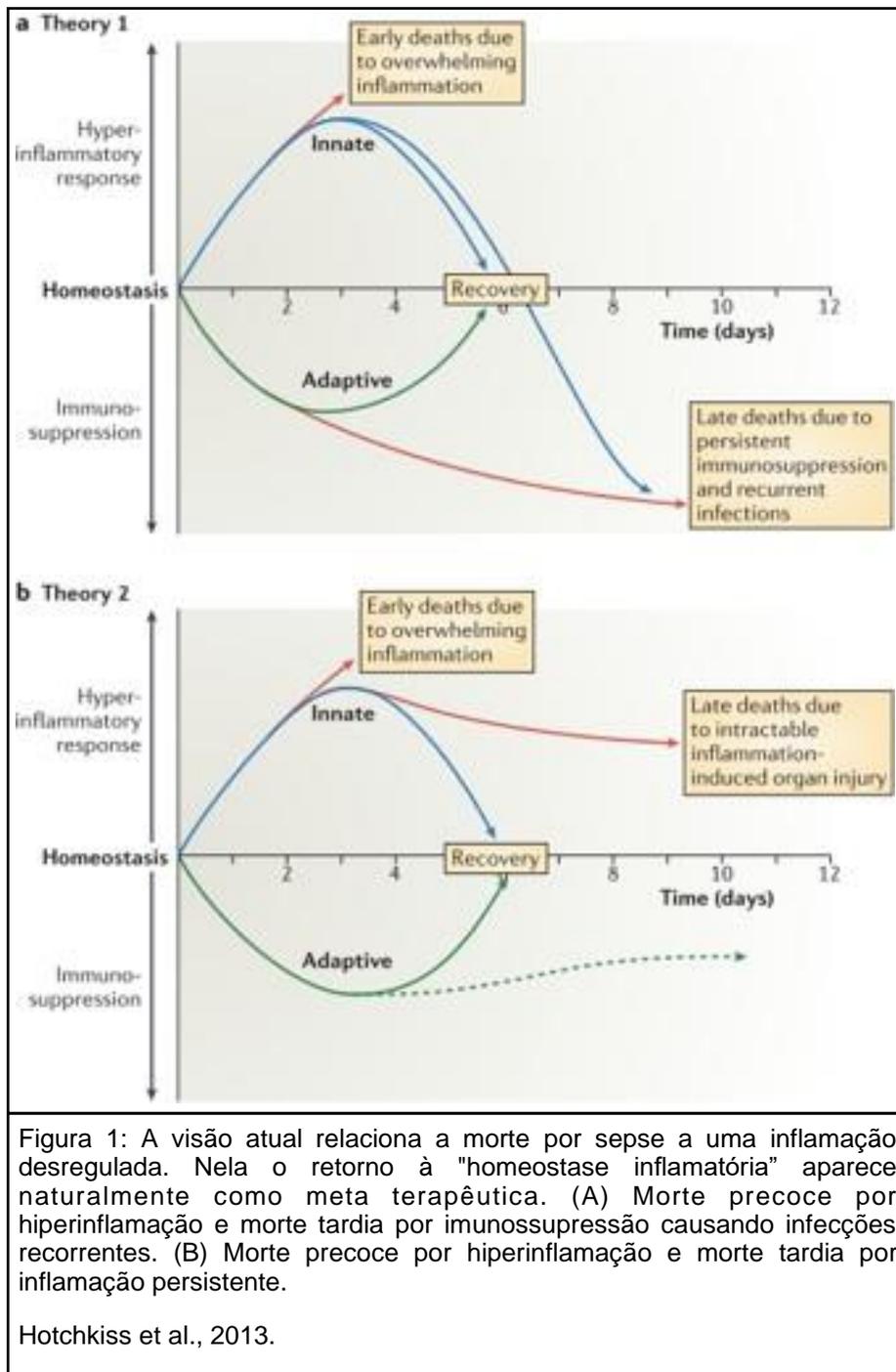
A visão predominante da fisiopatologia da sepse descreve um processo inflamatório desregulado, ou seja, de intensidade inapropriada, podendo se referir tanto um estado hiperinflamatório como um estado hipoinflamatório. Este processo é desencadeado por uma infecção, diferindo de causas não-infecciosas de inflamação sistêmica, como o politraumatismo, pancreatite, queimaduras extensas e cirurgias de grande porte, entre outras.

O desenvolvimento da sepse e o seu diagnóstico implica no surgimento de uma disfunção orgânica causada por esta inflamação desregulada. Nesta linha, considera-se como parte da fisiopatologia da sepse qualquer alteração do sistema imune que neste contexto de infecção complicada tem o potencial de estabelecer as disfunções orgânicas. Tal abordagem leva a um grande número de hipóteses e linhas de pesquisa.

A evolução natural de organismos mais complexos, como os mamíferos, deu-se na presença de bactérias. Naturalmente, atingir um equilíbrio na relação com microorganismos como vírus e bactérias é uma condição necessária a sobrevivência dos indivíduos e a evolução das espécies. Os processos imunes e seus constituintes são altamente preservados na natureza, para exemplo, podemos citar o Toll-Like Receptor (TLR), que pode ser observado em espécies tão distantes como o ser humano e a mosca drosófila. (Marshall, 2008)

Para Marshall, a complexidade, ambivalência e redundância dos fenômenos inflamatórios, e o nosso entendimento ainda parcial deles, tem contribuído para a grande dificuldade em obtermos uma terapia efetiva para a sepse. (MARSHALL, 2016)

Se não é possível, no escopo desta revisão, esgotar cada teoria já formulada a respeito da fisiopatologia da sepse, existem alguns eixos principais



onde assentam-se teorias mais aceitas e que inclusive já chegaram a embasar a formulação de potenciais terapêuticas.

A caracterização mais aceita é de uma reação inflamatória desregulada, promovida por citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. A fase inicial da

sepsis, nos primeiros dias, mostra um exuberante estado inflamatório facilmente observável clinicamente e associado ao desenvolvimento de lesões a órgãos que não estavam inicialmente acometidos. A doença pode cursar com perda de função respiratória, cardiovascular, renal, digestória, hematológica (coagulação), entre outras. Nesta fase inicial o tratamento intensivo pode oferecer suporte vital aos sistemas orgânicos acometidos, garantindo em muitos casos a sobrevivência do paciente. Esta fase hiperinflamatória tende a mascarar uma concomitante atividade anti-inflamatória, associada a regeneração dos tecidos envolvidos, mas também associada com imunossupressão e infecções recorrentes. (Fig. 1) (ANGUS E VAN DER POLL, 2013)

O entendimento dominante é que o disparo inicial da resposta inflamatória na sepsis ocorre mediante receptores específicos de reconhecimento de padrões moleculares (PRR) que podem reconhecer padrões associados aos patógenos (PAMP) e também moléculas associadas a lesão celular do hospedeiro (DAMP). (WIERSINGA, 2014)

Os PRR são centrais no desenvolvimento da resposta inflamatória (Fig. 2). Os mais bem estudados são os receptores *Toll-like* (TLR) e os *Nod-like* com um domínio PYR N-terminal (NLRP).

Os TLR são receptores com ectodomínios que mediam o reconhecimento de PAMPs. A sinalização via TLR leva a aumento da transcrição de interleucinas (IL) pró-inflamatórias mediada pelo fator de transcrição NF- κ B. Entre várias IL pró-inflamatórias, de particular interesse é a transcrição das IL-1 β e IL-6.

Os TLR reconhecem PAMPs constituintes da parede celular bacteriana como o lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias gram-negativas (TLR tipo 4) e também elementos de bactérias gram-positivas, vírus e fungos (TLR tipo 2). Alguns tipos podem trafegar até o endossomo, onde reconhecem padrões moleculares de ácidos nucleicos dos patógenos.

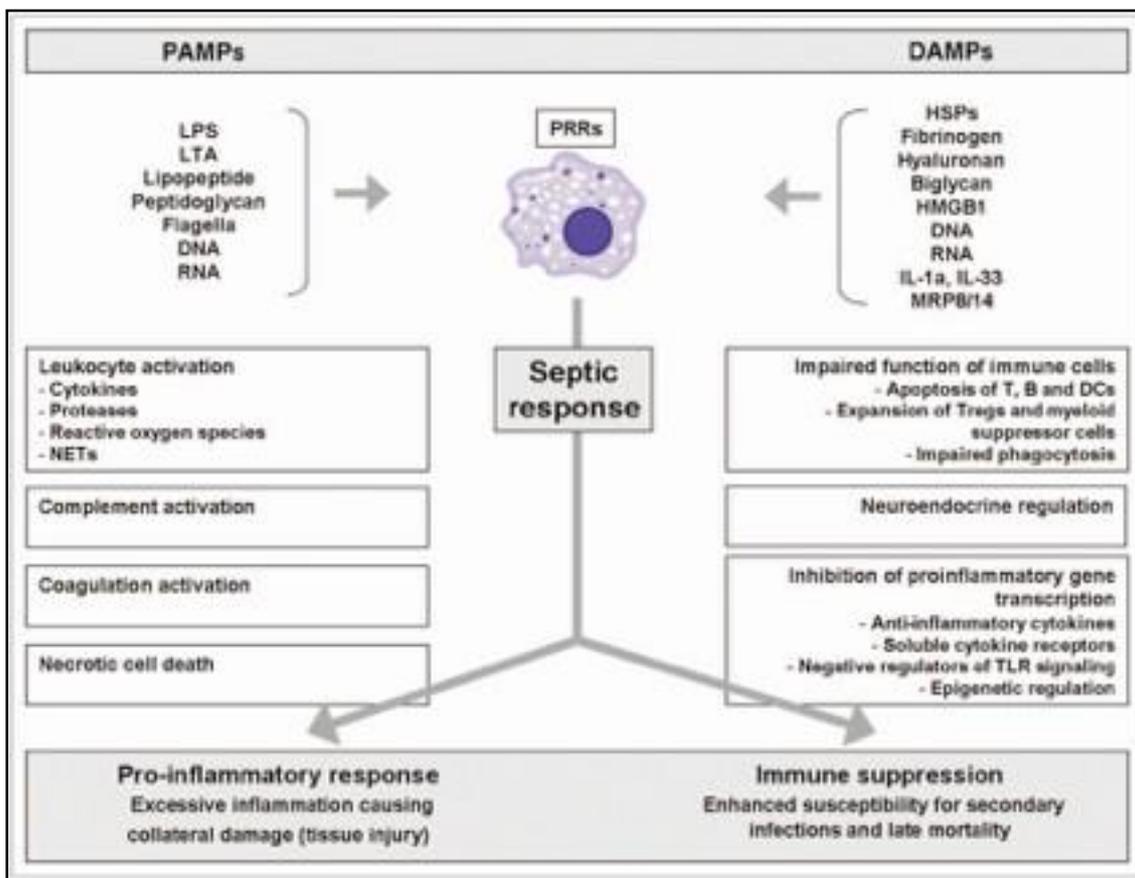


Figura 2. Na visão dominante da inflamação na sepse, os receptores de reconhecimento de padrões (PRR), ao serem estimulados por padrões moleculares do patógeno (PAMP) ou de lesão do hospedeiro (DAMP) desencadeiam a reação inflamatória. Esta resposta séptica tem mecanismos pro-inflamatórios e anti-inflamatórios, que, desregulada, pode causar hiperinflamação ou imunossupressão.

Wiersinga et al., 2014

A IL-1 β é considerada o principal mediador inflamatório. Ela é transcrita em sua forma inativa, pró-IL-1 β , e a sua ativação depende de mais uma camada de sinalização, onde se inclui o receptor NLRP.

Os NLRP são receptores intracelulares envolvidos na montagem do inflamassomo, que é uma plataforma molecular de ativação inflamatória necessária para ativação da pró-IL-1 β e IL-18 e sua subsequente liberação. Entre os NLRP capazes de ativar o inflamossomo, a atenção dos pesquisadores tem recaído sobre o NLRP do tipo 3 (NLRP3).

O inflamassomo NLRP3 pode ser ativado por DAMPs como os cristais de ácido úrico e o DNA em dupla fita, mas também na presença de PAMPs. A ativação do NLRP3 também se dá em resposta ao efluxo de potássio, à atuação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e à presença de adenosina

trifosfato extracelular (eATP). O inflamassomo NLRP3 induz a ativação da caspase-1, que, finalmente, causa a ativação da IL-1 β e também da IL-18.

Esta ativação inicial a partir dos PRRs leva ao disparo de processos do imunidade inata e adquirida. A hiperinflamação inicial está relacionada à imunidade inata, aqui, uma resposta exagerada pode levar à disfunção de múltiplos órgãos e óbito. Os óbitos tardios podem ser secundários a persistência da inflamação inicial, ou associados a um estado imunossupressivo. A hipótese de que este estado imunossupressivo relaciona-se com uma falha na ativação da imunidade adquirida tem recebido mais atenção dos pesquisadores.

Após a sinalização inicial via PRR células da imunidade inata como o monócito, macrófago e neutrófilo secretam grandes quantidades de citocinas e são recrutadas ao sítio da infecção. A intensa liberação de TNF, IL-1, IL-6, IL-8 provoca a chamada “tempestade de citocinas” que caracteriza a fase hiperinflamatória.

Os níveis aumentados de citocinas causam vasodilatação e propiciam a ativação de mediadores secundários, como o óxido nítrico (NO), fator ativador plaquetário, leucotrienos e prostaglandinas, além da ativação do sistema do complemento. (WIERSINGA 2014)

Vários são os efeitos desta tempestade de citocinas. Os efeitos mais diretos nas células imunes são a quimiotaxia, a liberação de EROS (“*oxidative burst*”), aumento da fagocitose e eliminação do patógeno com algum grau de lesão tecidual. Mas outros mecanismos também são importantes na instalação da reação inflamatória na sepse.

A reação inflamatória local cursa com vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar, mediados por histamina, e ativação da coagulação. Estes fenômenos são responsáveis pelos sintomas cardinais da inflamação: calor, vermelhidão, inchaço e dor. A reação inflamatória localizada, adequadamente contrabalançada por mediadores anti-inflamatórios não vai se tornar um quadro de sepse. Mas com inflamação desregulada, de maior intensidade, as implicações sistêmicas aparecem.

Acredita-se que em grande parte a vasodilatação na sepse ocorre por síntese aumentada de NO, que é um potente vasodilatador, pela enzima óxido-nítrico sintase induzida (iNOS). Esta via foi alvo de intensa pesquisa no passado, visto que a iNOS tem sua atividade aumentada na sepse. Contudo, os ensaios clínicos ainda não mostraram valor terapêutico nesta abordagem. (STRAND, 2000) (SHARAWY, 2014)

O aumento da permeabilidade capilar permite a passagem de fagócitos e proteínas para a área inflamada, permitindo a remoção de bactérias e células lesadas. Além deste mecanismo já bastante estabelecido, recentemente tem sido descrita como elemento importante da fisiopatologia da sepse a disfunção do glicocálice endotelial.

O glicocálice é uma fina camada que reveste o endotélio, de composição predominantemente protéica. Inicialmente considerada como uma camada inerte, tem funções fisiológicas muito relevantes para o desenvolvimento da sepse. Entre elas destaca-se: manutenção de uma barreira efetiva diminuindo a permeabilidade vascular, mediação da produção de ON, assim como da enzima superóxido dismutase, manutenção de fatores anticoagulantes em sua estrutura, e a modulação da resposta inflamatória através da prevenção da adesão de leucócitos e retenção de vários mediadores pró e anti-inflamatórios. (MARTIN, 2016)

Durante a inflamação, a exposição a mediadores pró-inflamatórios causa ativação endotelial, com aumento da transcrição de moléculas de adesão de leucócitos, diminuição do gradiente oncótico com formação de edema intersticial, e perda das funções fisiológicas do glicocálice. Apesar deste papel bem demonstrado na gênese de alterações associada a sepse, não há uma proposta terapêutica promissora envolvendo as alterações glicocalicinais. (CHELAZZI, 2015)

A ativação da coagulação pode levar a trombose de capilares e pequenos vasos, hipoperfusão de tecidos e isquemia dos órgãos. O processo se inicia com formação de trombina a partir da mediação do fator tecidual. Este fenômeno está relacionado a níveis baixos de anti-trombina 3 e de proteína C ativada e a redução da fibrinólise. A modulação deste e de outros fatores

relacionados à coagulação foi alvo de vivo interesse em décadas passadas, chegando a ensaios clínicos de fase 3, mas da mesma forma, não se logrou êxito em produzir uma terapia baseada nestes princípios.(Levi, 2005) (WIERSINGA, 2014)

Um achado que recentemente tem recebido mais atenção dos pesquisadores é a formação de “armadilhas extracelulares de neutrófilos” (NET). Trata-se de uma formação extracelular, capaz de aprisionar patógenos na circulação sanguínea. Ela se forma pela extrusão de porções do DNA e proteínas globulares de neutrófilos, chegando a formar redes de centenas de nanômetros de extensão, constituindo uma barreira física que pode eliminar mais bactérias do que os neutrófilos fagocitariam. As NETs são induzidas por mediadores inflamatórios e ativação de PRRs, muito precocemente na resposta inflamatória. Por outro lado, especula-se que a formação excessiva de NETs pode ter efeito pró-inflamatório, dado que o DNA humano atua como DAMP. (WIERSINGA, 2014)

O componente de imunossupressão na sepse está relacionado a diversas alterações fenotípicas, liberação de mediadores anti-inflamatórios e redução da atividade da imunidade inata e adquirida. O quadro clínico observado é o de infecções novas e recorrentes após a resolução da infecção inicial, causadas por organismos de perfil oportunista, de pouca virulência como *acinetobacter spp* e *candida spp*, e também por reativações de vírus como citomegalovírus e herpes simples.

Os neutrófilos podem apresentar redução de suas funções de remoção de patógenos, produção de EROS, e em particular, tem se descrito a perda da capacidade quimiotática, o que parece estar relacionado a diversos mecanismos de sinalização. (ALVES-FILHO, 2010)

Outras células da imunidade inata, como monócitos, macrófagos e as células dendríticas (DC) também apresentam durante a sepse alterações relacionadas a imunossupressão. As células podem mudar o perfil das citocinas liberadas, passando de um perfil pró-inflamatório de TNF, IL-1 β e IL-6 para um perfil com IL-10 e inibidor do receptor da IL-1,

A expressão de HLA-DR serve como parâmetro da ativação de monócitos, com níveis mais baixos indicando um fenótipo imunossuprimido. Em um estudo clínico, este fenótipo se associou a maior mortalidade em pacientes sépticos (HYNNINEN, 2003)

A depressão da imunidade adquirida é a forma mais estudada da imunossupressão associada a sepse. De fato, a emergência de germes que são comensais na flora normal parece estar relacionada a disfunção da imunidade adquirida.

Um importante estudo de Boomer e outros (2011) comparou células imunes do tecido pulmonar e esplênico de pacientes que morreram de sepse com tecido esplênico de doadores em morte encefálica e tecido pulmonar de pacientes submetidos a pneumonectomia. Foi demonstrado uma importante redução na capacidade de secretar citocinas, um fenótipo imunossupressivo de todas as linhagens, e redução da população de linfócitos CD4+ e CD8+. (BOOMER, 2011)

Em estudos com pacientes sépticos e politraumatizados, os linfócitos T CD4+ (Th, *helper*, CD4+, CD25-) tiveram uma secreção reduzida de IL-1 e IL-2. Da mesma forma, em modelos de sepse foi demonstrada a redução da atividade das células Th17, em um perfil com níveis reduzidos de IL-17 e IL-22, o que predispõe ao surgimento de infecções fúngicas. Corroborando, um interessante estudo pré-clínico de administração de IL-7 mostrou aumento da resposta dos linfócitos Th17 e protegeu de mortalidade em infecções por *candida albicans*. (CHEADLE, 1993) (VENET, 2004) (UNSINGER, 2012)

Além de ter a sua função deprimida, as células imunes parecem ter populações reduzidas durante a sepse devido a apoptose. O aumento da apoptose de células imunes é um fenômeno observado durante a sepse em todas as linhagens celulares da imunidade inata e adquirida, com exceção do neutrófilo, na fase inicial da doença, e do linfócito T regulador (Treg, CD4+ CD25+), que é uma célula de perfil imunossupressor. (GIRARDOT, 2016)

A redução do número absoluto de linfócitos está associada a mortalidade em pacientes sépticos. Durante a sepse, demonstrou-se que a

população de linfócitos Treg mantém-se normal ou aumentada desde a apresentação inicial, e que os pacientes que vieram a falecer tiveram redução da linfocitometria às custas da redução da população dos linfócitos Th. A imunossupressão relacionada a mortalidade tardia da sepse, conclui-se, é devida ao aumento proporcional dos Tregs pela diminuição da população de linfócitos Th. (DREWRI, 2014) (VENET, 2004)

Estudos de necrópsia mostram que pacientes sépticos parecem ainda ter infecção quando morrem de sepse. Se a resposta inflamatória não foi suficientemente intensa para eliminar a infecção, e antes causou a morte do paciente, ou por outro lado, se os pacientes morreram de imunossupressão, é uma controvérsia que ainda persistirá. A busca da homeostase imune tem pautado a pesquisa em sepse nas últimas décadas, infelizmente, sem um avanço concreto.

A pesquisa em sepse

Mais de 100 ensaios clínicos com resultado negativo nas últimas 4 décadas testemunham a grande dificuldade de comprovar a premissa de que, sendo o resultado de uma inflamação desregulada, a sepse seria suscetível a terapias que modulem a resposta inflamatória.(MARSHALL, 2014)

A única medida específica de combate a sepse é o tratamento da infecção com antimicrobianos ou cirurgia quando for o caso. Os demais aspectos do tratamento são medidas de suporte às disfunções orgânicas, típicas do tratamento intensivo, às quais se atribui os melhores resultados obtidos nos últimos anos.

Desde o fracasso do Eritoran, um fármaco bloqueador do receptor TLR4 em um ensaio clínico de fase 3, muito tem se discutido sobre a pesquisa em sepse. Tratava-se de uma estratégia promissora, solidamente baseada em pesquisa pré-clínica, endossada por renomados especialistas. (OPAL, 2013)

Há um certo consenso de que é necessário abandonar um paradigma de pesquisa em sepse que se mostrou estéril, que incluiria: (COHEN, 2015)

- Modelos animais reducionistas, ultra-simplificados, onde os animais não recebem nenhuma medida de suporte e nem antibióticos, que não reproduzem completamente a sepse em humanos, como por exemplo o modelo de ligadura e punção colônica em camudongos, e modelos com translação questionável quando se compara a expressão genética, entre outras questões. (OSUCHOWSKI, 2013)

- Estratégias ingenuamente simples, assumindo que intervir em uma entre mais de uma centena de moléculas relacionadas a resposta imune poderia alterar os desfechos da sepse.

- A definição da doença não ser suportada por achados patológicos comuns a todos os pacientes - uma doença sem "padrão-ouro" para diagnóstico.

- Ensaios clínicos com critérios de inclusão inadequados, que incluem pacientes com apresentações muito diferentes da sepse, deixando de individualizar grupos que poderiam se beneficiar de determinada intervenção.

- Ausência de considerações adequadas de farmacocinética, farmacodinâmica e do momento oportuno de administração do fármaco em teste.

- Ausência de caracterização dos fenótipos por marcadores bioquímicos ou celulares para alocação nos ensaios clínicos. Um exemplo negativo é um estudo de inibição de TNF, onde os pacientes apresentavam nível sérico de TNF variando de 7 a 57.000 pg/mL. Um exemplo positivo é a proposta de um ensaio clínico que recruta apenas pacientes sépticos com hiperativação de macrófagos secundária a IL-1 β , onde seria testado um inibidor do seu receptor. (PANCEK, 2004)(SHAKOORY, 2016)

Atualmente a pesquisa tem se voltado mais para a disfunção endotelial ou do glicocálice, com 7 estratégias terapêuticas em diferentes estágios de evolução, e para imunossupressão relacionada a sepse, com 6 propostas de estimulação da imunidade adquirida em teste. Existem ainda mais duas linhas de pesquisa com modulação de IL e uma que pesquisa reflexos colinérgicos.

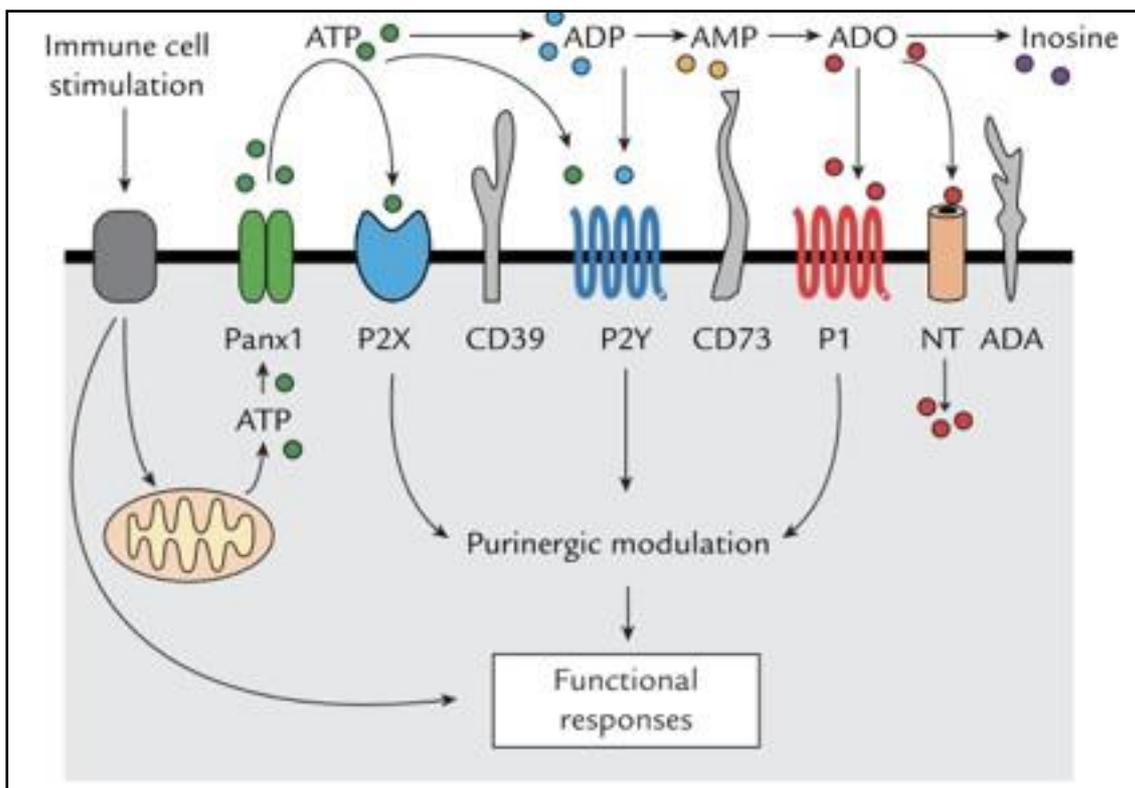


Figura 3. Elementos da sinalização purinérgica nas células imunes. O ATP pode ser liberado de células distantes, em inflamação, necrose ou apoptose. Também pode ser liberado pela própria célula, para sinalização autócrina. A ativação imune causa deslocamento da mitocôndria para uma região próxima aos canais de panexina (Panx-1), responsáveis pela liberação de ATP mitocondrial. O ATP é agonista dos receptores P2X (ionotrópicos) e P2Y (metabotrópicos, ligados à proteína G). É hidrolizado sequencialmente em ADP e AMP pela CD39, e em adenosina pela CD73. A adenosina é agonista de receptores P1. Ela pode ser inativada pela amino-deaminase (ADA) gerando inosina ou internalizada.

Ledderose et al., 2016

Não há uma pesquisa clínica em andamento com sua hipótese baseada no sistema de sinalização purinérgico. Existe um ensaio clínico em curso envolvendo indiretamente a sinalização purinérgica, no contexto da falência renal aguda associada à sepse, cujo recrutamento deve se completar no próximo ano. (PETERS, 2016)

A relação do sistema de sinalização purinérgica com a fisiopatologia da sepse, não obstante um corpo considerável de evidências pré-clínicas, ainda não está bem caracterizada clinicamente.

O sistema de sinalização purinérgica

O sistema de sinalização purinérgica foi descrito inicialmente por Burnstock na década de 1970, como um sistema de sinalização não-adrenérgica e não-colinérgica.

A sinalização purinérgica é objeto de intensa pesquisa atualmente, especialmente nas áreas de oncologia, inflamação e neurotransmissão. Uma consulta a base de dados Pubmed com a palavra "purinergic" retorna cerca de 1.000 publicações por ano nos últimos anos.

Os receptores purinérgicos são do tipo P1, sensibilizados pela adenosina, ou P2, que tem como agonistas os nucleosídeos ATP, UTP, ADP e UDP. Os receptores P2 são divididos em P2X e P2Y.

A expressão destes receptores é praticamente ubíqua entre as células eucariotas, e até em plaquetas e hemáceas. Um exemplo da utilidade clínica da via de sinalização purinérgica são os antiagregantes plaquetários que bloqueiam o receptor purinérgico P2Y₁₂, como o clopidogrel. (DI VIRGILIO, 2015)

São descritos sete receptores do tipo P2X, P2X₁₋₇, ionotrópicos, que sinalizam por aumento rápido de íons cálcio no meio intracelular. Todos eles tem como agonista o ATP.

Os receptores P2Y são do tipo metabotrópicos, ligados à proteína G, e atualmente são descritos 8 subtipos: P2Y_{1,2,4,6,11-14}. Eles têm como agonistas os nucleosídeos ATP, UTP, ADP e UDP.

Os receptores P2 nas células imunes estão geralmente ligados à ativação inflamatória destas células, com destaque para P2X₇ e P2Y₂.

Os receptores P1 são receptores de adenosina. Estão descritos os tipos A₁, A_{2a}, A_{2b} e A₃. O tipo A_{2a} é o mais estudado em células imunes, mas também há alguns estudos sobre o A₃. Os efeitos da sinalização P1 são anti-inflamatórios e relacionados à cicatrização de tecidos.

Um componente crucial da sinalização purinérgica são as enzimas ectonucleotidasas CD39 e CD73 (ecto-nucleosídeo-trifosfo-difosfohidrolase e ecto-5'-nucleotidase) e a enzima amino-deaminase (ADA). São enzimas

expressadas externamente nas membranas celulares que convertem ATP, que é o principal agonista purinérgico, em seus metabólitos ADP e adenosina, criando um sistema que consegue regular precisamente a concentração extracelular, ou pericelular, de cada um deles, controlando assim suas propriedades de sinalização. (figura 3).

O ATP, principal “moeda de troca” energética da célula, encontra-se no

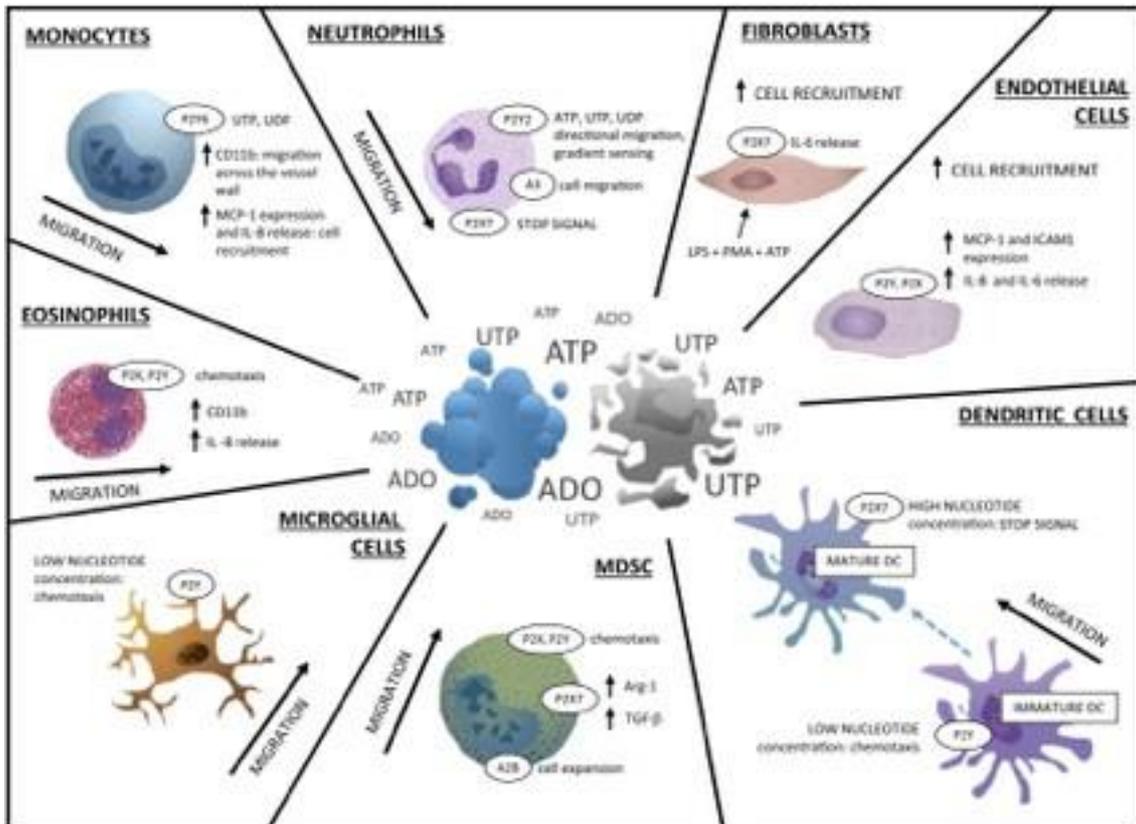


Figura 4. Diversas ações do sistema purinérgico nas células imunes

DiVirgilio e Vuerich, 2015

espaço intracelular. A concentração intracelular de ATP situa-se na faixa milimolar, e a concentração extracelular (eATP) é muito menor, na faixa nanomolar baixa, gerando um gradiente de concentração de 10^6 .

Sendo uma molécula polar, o ATP não se difunde pela membrana plasmática, mantendo este gradiente de concentração. Portanto, qualquer alteração no nível de eATP, por morte celular ou por um processo ativo de exocitose, constitui-se em um potente sinal bioquímico, claramente distinguível.

Sob algumas condições como lesão tecidual por isquemia, lesões físicas, necrose e diversas formas de apoptose, as células podem liberar ATP que, hidrossolúvel, rapidamente se difunde pelo espaço extracelular, vindo a estimular receptores ATPérgicos em outras células, constituindo a sinalização parácrina por ATP.

A ativação de células imunes causa a secreção de ATP para o espaço pericelular, onde, modulado pelas ectonucleotidases, vai propiciar um circuito de sinalização autócrina, do qual depende o engajamento da célula imune em diversas funções. (DI VIRGILIO, 2015)

Os receptores P2 tem sensibilidades variadas ao ATP, o que constitui mais uma camada de complexidade na sinalização ATPérgica. Os receptores P2X7 são os menos sensíveis, requerendo concentrações maiores de eATP ($EC_{50} > 100 \mu M$), enquanto os demais P2X e P2Y tem maior afinidade pela molécula e são ativados em concentrações muito menores (EC_{50} a partir de $0,1 \mu M$). Este efeito permite um padrão diferente de sinalização ATPérgica em locais próximos a liberação maciça de ATP, quando comparados a pontos mais distantes. (JUNGER, 2011)

Sinalização purinérgica na sepse

A sinalização por purinas nas células imunes em geral (fig. 4) e na sepse em particular já está bastante demonstrada e tais achados tem sido reproduzidos por laboratórios de todo o mundo. A seguir uma revisão de alguns achados importantes que relacionam sinalização purinérgica e resposta imune na sepse.

Imunidade inata

A sinalização purinérgica está relacionada ao engajamento do neutrófilo na resposta imune, em especial na quimiotaxia.

Em 2006, Chen e outros estudaram a sinalização purinérgica na migração dos neutrófilos por um gradiente de fMLP, um PAMP capaz de desencadear a quimiotaxia. (CHEN, 2006)

Em experimento com camundongos P2Y2KO e A3KO, ou seja, que não expressam os receptores P2Y2 e A3, observou-se que as células KO, em especial as que não tem o receptor P2Y2, perdem a capacidade de migração direcional tanto *in vivo* como *in vitro*. Além disso, quando o eATP foi removido com apirase, uma enzima nucleotidase, a célula também perdeu a orientação direcional. O tratamento com inibidores seletivos dos receptores P2 em camundongos “wild-type”, ou seja, com expressão normal dos receptores, confirma a participação dos receptores P2Y2.

Foi proposto um mecanismo no qual o estímulo do fMLP provocou secreção de ATP via canais de panexina no polo celular mais próximo ao estímulo, resultando em agonismo P2Y2 nesta região, e por efeito das ectonucleotidases, um estímulo A2a nas regiões mais afastadas, levando a polarização da célula e migração em direção ao quimiotático. (figura 4).

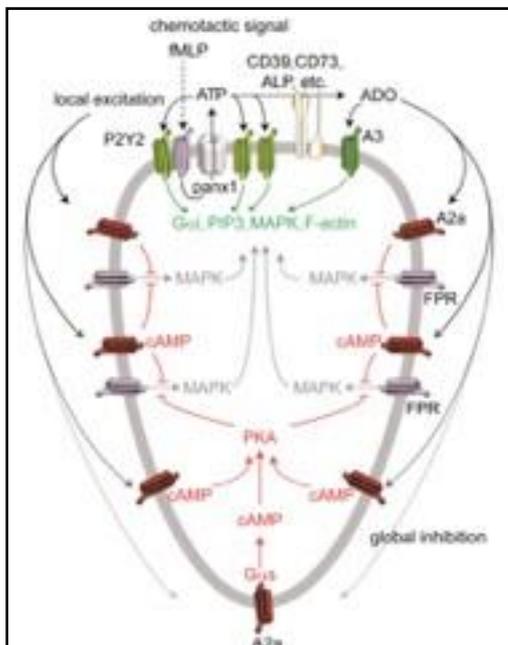


Figura 5. Sinalização purinérgica autócrina é necessária para a polarização e migração de neutrófilos em um gradiente quimiotático.

Bao et al., 2014

O fato de que a migração direcional de neutrófilos depende de eATP e de receptores purinérgicos foi a seguir comprovado por diversos autores, em modelos animais de sepse e modelos *in vitro* com neutrófilos humanos estimulados por PAMPs e por ILs, sempre em uma combinação de receptores P2Y2 e

A2a/A3. Um adendo interessante foi proposto por Kukulski, ao demonstrar que a migração transendotelial de neutrófilos também depende de receptores P2Y2 nos endotélios. (KUKULSKI, 2007, 2009, 2010) (MCDONALD, 2010) (BAO, 2013)

A ativação do neutrófilo a um fenótipo inflamatório também depende de sinalização ATPérgica. A expressão de CD11b, um marcador de ativação celular, a eliminação de bactérias e o "oxidative burst" também dependeu do mecanismo de ativação autócrina descrito, por outro lado, o nível plasmático de ATP encontrado em um modelo de sepse animal poderia causar estimulação P2 de maneira parácrina. (Figura 5.) (CHEN, 2010) (BAO 2014) (SUMI, 2014)

Uma comunicação recente aponta o receptor P2X7 como responsável pela liberação de IL-1 β através da ativação do inflamassomo NLRP3, em neutrófilos humanos expostos a LPS. Este achado corrobora observações anteriores de que o receptor P2X7 controla a liberação de IL-1 β e também de IL não dependentes do inflamassomo. (KARMAKAR, 2016) (MCDONALD, 2010, KUKULSKI, 2011, SANTANA, 2014)

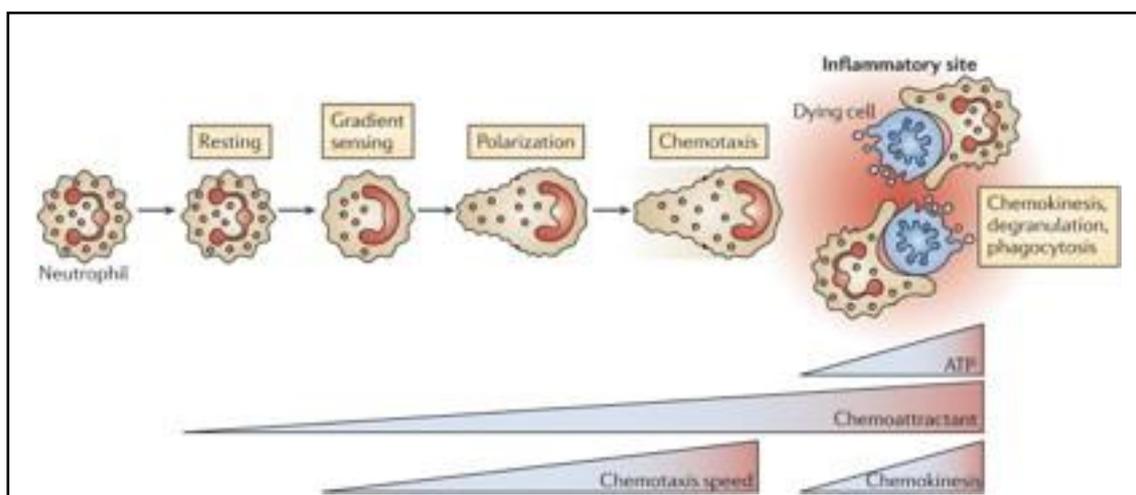


Figura 6. Visão esquemática do recrutamento do neutrófilo pela sinalização parácrina. Níveis baixos de eATP induzem quimiotaxia ao sítio inflamatório. Lá o neutrófilo encontra níveis altos de eATP causando agonismo P2X7, que resulta em eliminação dos patógenos, mas também em algum grau de lesão tecidual.

Junger, 2011.

Além disso, um outro achado clinicamente relevante para o paciente crítico é que a infiltração pulmonar de neutrófilos, um fenômeno que ocorre na

Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto (SARA), uma complicação pulmonar frequente em casos de sepse, também depende do mecanismo autócrino e parácrino (via P2X7) de sinalização purinérgica. (INOUE, 2007) (MONÇÃO-RIBEIRO, 2011)

Monócitos e macrófagos também tem sido alvo do interesse dos pesquisadores em sinalização purinérgica, e o mesmo mecanismo de ativação autócrina eATP-P2 tem se revelado necessário para ativação celular, quimiotaxia e liberação de interleucinas. (SAKAKI, 2013) (KRONLAGE, 2010) (KUKULSKI, 2007) (GICQUEL, 2015)

Também foi recentemente demonstrado que o macrófago pode, além de amplificar sua ativação pelo circuito autócrino eATP-P2, reduzi-la hidrolizando o eATP através do aumento na expressão de ectonucleotidases. (COHEN, 2016)

Com relação à sinalização parácrina, sabe-se que o ATP secretado por células apoptóticas induz a migração, diferenciação e atividade fagocítica de monócitos/macrófagos em um mecanismo dependente do receptor P2Y2. (ELLIOT, 2009)

A síndrome de ativação macrofágica é reconhecida como uma gravíssima apresentação da sepse que cursa com disfunção hepatobiliar e distúrbios da coagulação, citopenias e aumento de ferritina, caracterizada pela presença de hemofagócitos (macrófagos contendo células hemáticas), em um mecanismo de ativação excessiva mediado por IL-1 β . A potencial conexão entre a sinalização ATPérgica e hiperativação macrofágica ainda não foi estudada.

Finalizando, parece ser de interesse que os receptores P2Y apresentam o fenômeno de dessensibilização, ou seja, passam a apresentar menor resposta frente a níveis prolongadamente elevados de eATP, como já demonstrado em macrófagos. Especula-se que isto possa contribuir para a hiporresponsividade imune observada nas fases tardias da sepse. (DEL REY, 2006)

Imunidade adquirida

Vários autores têm proposto que a sinalização purinérgica autócrina e parácrina podem controlar o estado de ativação dos linfócitos e sua responsividade.

Os estudos que melhor descrevem este mecanismo foram publicados por Schenk et al. e pelo grupo de Junger, descrevendo que a ativação do linfócito T após o estímulo de seu receptor (TCR) induziu a produção aumentada de ATP mitocondrial e liberação de ATP na sinapse imune, e que os receptores P2X1 e P2X4 passam a localizar-se na região voltada a sinapse imune, e, finalmente, que a transcrição de mediadores pró-inflamatórios depende do agonismo P2X1 e P2X4. (SCHENK, 2008)(WOEHRLE, 2010)

Como os receptores P2X tem níveis diferenciados de afinidade pelo ATP - P2X1 com EC₅₀ de 0,1 a 1 µM, P2X4 1 a 10µM e P2X7 > 100 µM, estudou-se a influência do nível de ATP pericelular na ativação da célula.

Junger e outros também demonstraram que o reconhecimento do antígeno pelo Th na sinapse imune depende de um "tônus" ATPérgico pericelular mínimo para manter o agonismo P2X1 pela via de sinalização autócrina, e, após a ativação celular, suas funções efetoras dependem do agonismo P2X4 e P2X7, que são obtidos com níveis mais altos de eATP. (LEDDEROSE, 2015)(YIP, 2009)

Complementando a demonstração de que as células T dependem de sinalização ATPérgica para assumir um perfil pró-inflamatório, demonstrou-se que o circuito autócrino de ativação via P2X inibe a proliferação e função dos Tregs, inibindo sua ação imunossupressora. Corroborando, um estado anérgico foi obtido pelo agonismo A2, prevenindo a ativação de células Th, e sua secreção de interleucinas. (SCHENK, 2011)(ZAREK, 2008)

Uma última relação entre a sinalização ATPérgica e a fisiopatologia da sepse é que a apoptose de células T parece ser estimulada pelo eATP e depender do receptor P2X7. Da mesma forma, com relação a piroptose, que é uma forma de apoptose relacionada à inflamação, há evidências de que o

processo seja mediado pelo circuito de sinalização autócrina eATP-P2X7. (LÉPINE, 2006)(SHOJI, 2014)(WALLACH, 2011)(GASSART, 2015)

Descrição em humanos

A expressão de receptores purinérgicos em células imunes humanas está bem caracterizada em modelos pré-clínicos. O neutrófilo, em modelos experimentais de sepse apresentou maior expressão do receptor P2Y2 e A2a, quando comparado aos outros receptores purinérgicos, e que o P2X7 tem expressão constitutiva na célula não-ativada, sem descrição de aumento desta expressão após ativação. Finalmente, quanto ao linfócito T, está descrito que expressa P2X7, P2X1, P2X4 e A2a após ativação. (CHEN, 2006) (KARMAKAR, 2016) (YIP, 2009) (WOERLE, 2010) (FRIEBE, 2014)

O estudo clínico da sinalização purinérgica em pacientes sépticos ainda é incipiente. Um estudo alocou pacientes que se apresentavam à emergência de um hospital e mostrou que a expressão de receptores P2X1 estava aumentada em linfócitos T de pacientes sépticos quando comparados a voluntários saudáveis, e que por outro lado, a expressão de P2X4 e P2X7 estava inalterada. (LEDDEROSE, 2015)

Não localizamos outro relato de expressão de receptores purinérgicos em células imunes de seres humanos vítimas de sepse, assim como não há descrição da concentração de seu principal agonista, o ATP, e da atividade de nucleotidase em pacientes sépticos.

Parte III

4. Manuscrito

Os resultados desta pesquisa e a sua discussão são apresentados a seguir na forma de artigo.

Sepsis modulates extracellular ATP levels and purinergic receptor expression in human neutrophils: implications in diagnostic and therapeutic approaches.

Rafael O. Leite^{1,2}, Fernando da Silveira², Ana P.S. Bertoni³, Mayara Soares¹, Juliana H. Azambuja³, Nicolly E. Gelsleichter³, Morgana Dal Prá³, Lorryayne L.P. da Cruz³, Marcia R. Wink³, Roselia M. Spanevello¹, Elizandra Braganhol^{1,3*}.

¹Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

²Hospital Nossa Senhora da Conceição, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Corresponding Author

Elizandra Braganhol (E-mail: ebraganhol@ufcspa.edu.br)

Universidade Federal de Ciências da Saúde (UFCSPA)

Rua Sarmento Leite, 245 – Prédio Principal – sala 304

CEP: 90.050-170 Porto Alegre, RS, Brasil

Phone: +55 51 3303 8762

Abstract

Purpose: Purinergic signaling interplays with sepsis pathophysiology is widely documented in pre-clinical research. We speculated that alterations in purinergic signaling are also present in human sepsis.

Methods: Purinergic receptor mRNA expression in circulating neutrophils, serum ATP and serum nucleotidase activity was measured in a group of septic ICU patients, non-septic ward patients and healthy volunteers.

Results: Septic ICU patients (n=10) had mean age of 59,9 (23 - 80) years, SOFA score of 7,6 (4 - 11) points. Ward non-septic patients (n=10) had mean age of 70,5 (60 - 91) years Both groups had comorbidities like hypertension, diabetes or cancer. Neutrophils from septic patients neutrophils expressed 6 to 7 times more P2Y2 and A2a receptors mRNA level when compared to healthy volunteers (n=10) and non-septic ward patients. Serum ATP levels and nucleotidase activity was significantly elevated in septic patients when compared to controls.

Conclusion: We demonstrated purinergic signaling elements to be active in septic ICU patients. Adding to previous evidences, our findings suggest ATP, its receptors and nucleotidases are major players in sepsis development. Purinergic signaling, specially *ATPergic* signaling, provides a framework to develop diagnosis and therapeutic strategies in sepsis.

Key words: sepsis, extracellular ATP, nucleotidases, purinergic receptors, ATP, adenosine.

Background

Sepsis is among the major challenges in public health worldwide. Estimates point to a global incidence in excess of 30 million cases and a recent survey pointed global mortality at 35%. Sepsis pathophysiology and diagnosis are currently explained under a dysregulated host response to infection paradigm of overwhelming complexity. Disappointing results of several clinical trials for sepsis treatment in the last decades may be, in part, due to incomplete understanding of sepsis biology (Fleischman, 2016) (Vincent, 2014) (Singer, 2016) (Marshall, 2014).

Purinergic signaling system was described decades ago by Burnstock as a non-adrenergic non-cholinergic signaling system. Today, purinergic signaling is a hot research topic in the fields of inflammation, cancer, and others.

Purinergic receptors are classified in P1 adenosine (ADO) receptors and P2 nucleoside receptors, which bind to ATP, UTP, ADP and UDP. P1 receptors are divided in 3 sub-types, A1, A2a, A2b and A3, while P2 receptors are divided in 15 sub-types of P2X (ionotropic) or P2Y (G protein linked, metabotropic). They are ubiquitously expressed in eucariotic cells, and even in platelets and red blood cells. An example of their clinical use are P2Y₁₂ ADP receptor antagonists clopidogrel and ticagrelor.

ATP, the main cellular “energy currency”, has negligible extracellular concentrations, on a picomolar or low-nanomolar (ref) range, whereas intracellular levels reach the milimolar levels, a 10^6 gradient. ATP is released by necrotic and apoptotic cells, as a damage-associated molecular pattern (DAMP) or exocytosed under certain circumstances such as inflammation, causing a several fold increase in extracellular ATP (eATP) levels to reach nanomolar concentrations, what constitutes a distinct biochemical signal.

ATP acts as a paracrine and autocrine pro-inflammatory messenger for activating immune cells through P2 receptors. Immune response of neutrophils, monocytes, macrophages and T cells have been reiteratively shown to depend on eATP signaling. On the other hand, ADO signaling exerts anti-inflammatory and healing properties through P1 receptors.(Junger, 2011, Caglar, 2016)

Current evidences show that purinergic receptors are expressed in all immune cells lineages. Immune cells also express ectoenzymes capable of hydrolyze ATP to ADP (CD39, NTPDase), and further to ADO (CD73 5'Nucleotidase) and inosine (amino-deaminase, ADA). This unique mechanism of ATP exocytosis and hydrolysis offers a tight control of ATP and its metabolites pericellular concentration. As ATP and ADO have opposed roles in inflammation, immune cells can amplify and fine-tune inflammatory response in an autocrine fashion.

Indeed, pre-clinical research provides a wide biological precedent of purinergic signaling in sepsis pathophysiology, including activation of innate and acquired immunity, immune cells apoptosis and sepsis-related immunosuppression.

However, data on purinergic signaling is still scarce in actual septic patients. To confirm a role of purinergic signaling in human sepsis, we hypothesized that neutrophil P2X7, P2Y2, P2Y6, and A2a purinergic receptors expression, serum ATP and nucleotidases activity differs between septic patients and non-septic controls.

Material and Methods

Patients. Purinergic receptors expression was analyzed in a group of septic patients (n=10), and two control groups as described below. Septic patients were recruited in their first morning in the intensive care unit following an urgent admission caused by sepsis-led organic failure. Inclusion criteria were the presence of sepsis and and organic dysfunction, derived from Surviving Sepsis Campaign criteria at the time the patient arrived in ICU. After the publication of SEPSIS-3, patients inclusion was reassessed and all patients satisfied qSOFA criteria prior to ICU admission. (SINGER, 2016)

The first control group was referred as “non-septic group” and it was formed by the same number of general ward patients, suffering from chronic conditions associated with mild inflammatory activity such as arterial hypertension, diabetes or cancer. Patients in this group could be treating uncomplicated infections, but not meeting sepsis criteria, nor having an acute decompensation in the last 48 hours. The second control group was referred as “healthy group” and it was composed by healthy volunteers, with no chronic conditions and no acute illness in the past two days.

Patients were recruited in a tertiary care ICU in Porto Alegre, Brazil, and inpatient controls in the same hospital wards. All healthy volunteers, patients or their representatives filled a written consent form before blood samples were drawn. The study was approved by institutional Research Ethics Committee and was adherent to all applicable regulation. (Protocol number: 1.387.900).

Clinical Data. Data on gender, age, chronic illnesses, evidence of inclusion criteria in septic patients, their SOFA score and 28-day mortality were obtained from patients hospital records.

Serum ATP release measurement. ATP serum release was quantified in healthy, non-septic and septic patients using a firefly luciferase bioluminescence kit (ATPlite; PerkinElmer, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. Sample readings were done using Luminoskan Ascent microplateluminometer (Thermo Electron Corporation, Miliford, MA). Results are expressed as μM of ATP released using a standard ATP curve.

Nucleotidase activity. ATP, ADP and AMP hydrolysis were determined as described by Oses et al (2004). Briefly, the reaction mixture containing 3 mM ATP or ADP and 6 mM AMP as substrate, 112.5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) was incubated with approximately 1.0 mg of serum protein at 37°C for 40 min in a final volume of 200 μL . The reaction was stopped by the addition of 200 μL 10% TCA. The amount of inorganic phosphate (Pi) liberated was measured by the method of Chan et al. (1986) using KH_2PO_4 as standard. Protein was determined by the Coomassie Blue method according to Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard. Enzyme activities were expressed as nmoles of Pi released per minute per milligram of protein.

ADA activity assay. The adenosine deaminase activity was measured in healthy, non-septic and septic patients using the method of Giusti (1974). The reaction was started by the addition of the substrate (adenosine) to a final concentration of 21 mM and incubations were carried out for 1 h at 37°C. The pH of enzymatic assay of ADA was 6.5. The reaction was stopped by adding 106 mM/0.16 mM phenol–nitroprusside/mL solution. The reaction mixtures were immediately mixed to 125 mM/11 mM alkaline hypochlorite (sodium hypochlorite) and vortexed.

Ammonium sulfate 75 μ M was used as ammonium standard. Ammonia concentration is directly proportional to the absorption of indophenol at 620 nm. The specific activity is reported as U/L. One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

Neutrophil isolation. Heparinized blood were collected from healthy, non-septic and septic patients after obtaining informed consent, and neutrophils were isolated as previously described (Oh et al, 2008). Cells were harvested for RNA isolation and qPCR examination.

Gene expression evaluation by real-time PCR. Neutrophils from healthy, non-septic and septic patients were isolated as described above and the total RNA extraction, cDNA synthesis and real-time PCR (qPCR) were carried out as previously described (Braganhofel et al, 2015). Briefly, RNA samples were isolated using TRIzol Reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) and samples were DNase-treated with a DNA-free kit (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. First-strand cDNA synthesis was performed with 1 μ g of RNA using Reverse Transcription kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. The qPCR reactions were run on a Applied-Biosystem Step One Plus real-time PCR system using GoTaq PCR Master Mix (Promega) using specific primers for P2Y2, P2Y6, P2X7 and A2a (Table 1). All results were analyzed by the $2^{-\Delta/\Delta CT}$ method (Livak et al, 2001). TBP expression was used as the internal control gene for all relative expression calculations.

Data Analysis. Statistics were performed using Graphpad Prism 7 software and data were expressed as mean \pm SE and were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer post-hoc test (for multiple comparisons) or Mann-Whitney for non-parametric calculations. Differences between mean values were considered significant when $P < 0.05$.

Results

To investigate the participation of purinergic signaling in the pathophysiology of sepsis, the present study was composed by 3 experimental groups: healthy, ward non-septic and septic

volunteers. As purinergic signaling participates in a broad of inflammatory conditions, the ward non-septic group was included in order to differentiate purinergic events involved in sepsis from that present in inflammatory conditions non-sepsis associated. Written informed consent was obtained from all volunteers, or from their representative, and blood samples and clinical data were collected. Serum ATP was measured in septic (n=11) ward patients (n=7) and healthy controls (n=11). Serum nucleotidase activity was also determined in septic (n=11), ward patients (n=13) and healthy controls (n=5). Receptor expression was measured in septic (n=10), ward patients (n=7) and healthy controls (n=5).

SOFA score of septic patients had a mean of 7.5 (median 7.5, standard deviation of 2.2, range 4 - 11 points). Observed 28-day mortality was 50% among the 10 patients that had receptor expression measured. Age varied from 23 to 80 years to an average of 59.9 in septic patients, in ward patients age ranged from 60 to 91 years, averaging 70.5 while in healthy volunteers ranged from 19 to 39 years, averaging 26.1 Comorbid states were diagnosed in 9 septic patients, while all ward controls had comorbidities.(Table 2)

In order to evaluate purinergic signaling alterations in human sepsis, first we determined the release of extracellular ATP to blood serum of patients, serum ectonucleotidase activities were further accessed and, finally the expression of P1 and P2 purinoceptors important for neutrophil chemotaxy was performed.

Biochemical analysis of purinergic signaling elements showed significantly elevated concentration of the pro-inflammatory purinergic agonist ATP in serum from septic patients, averaging 28 μM (median 23, interquartile range 3.5 - 53, range 0 - 72), contrasting to undetectable concentrations in 9 of 10 healthy subjects (figure 1). Interestingly, ATP concentrations in non-septic ward patients ranged widely, with some patients displaying unexpectedly high serum ATP levels (median 19 μM , interquartile range 0 - 216, range 0 - 434), suggesting a differential P2 receptor activation in inflammatory process associated or not to sepsis condition.

In line with this, a significant elevation of serum ATPase, ~ 2.7 and 2.0 times, and ADPase activities, ~ 2.0 and 1.6 times, was found in septic patients when compared to healthy and ward non-septic groups, respectively (Fig. 2). The increased ATP hydrolysis determined in septic patients is in according to decreased ATP serum levels found in this group when

compared to ward non-septic subjects. The activity of 5'-nucleotidase (CD73), which is a key enzyme for extracellular adenosine generation, was similar among the 3 study groups. By other hand, serum adenosine-deaminase (ADA) activity was enhanced ~2 times in both ward non-septic and septic patients when compared to healthy volunteers (Fig. 2), suggesting a decreased immunosuppressive adenosine availability in blood serum of these groups.

Finally, purinergic receptors expression data revealed a six-fold increase in expression of P2Y2 and A2a receptors in circulating neutrophils from septic patients, as compared to controls. P2X7 receptor expression was similar between groups, and P2Y6 receptor expression was found to be decreased in septic patients, specially when compared to healthy controls. (Fig. 3)

Discussion

Extensive pre-clinical research on purinergic signaling and sepsis crosstalk supported the hypothesis that human sepsis is subject to purinergic signaling. In this study we have found purinergic signaling elements to be active in clinical sepsis, highlighting the role of eATP in sepsis.

Sepsis is currently conceived as a consequence of *dysregulated* inflammation, under a paradigm that inflammation is subject to opposing pro and anti-inflammatory forces that could be *regulated* to produce better outcomes. Purinergic signaling system fits in current views on sepsis pathophysiology, as pro-inflammatory P2 agonism is counter-balanced by anti-inflammatory P1 agonism, while pro-inflammatory ATP is hydrolyzed by nucleotidases, generating anti-inflammatory ADO.

Our findings of a P2 and a P1 receptor with similar expression increase, together with both serum ATP levels and nucleotidase activity elevation is a demonstration of opposing pro and anti-inflammatory forces acting in septic patients. These findings suggest a clinical level role for purinergic signaling in sepsis, adding evidences that purinergic signaling could provide a framework for therapeutic strategies.

In sepsis models, serum ATP was found to rise several fold a few hours after the inflammatory insult, then peak around 10 μ M and start falling after some hours. An important

point is that P2 receptors have different affinities for ATP, so the pattern of P2 activation might be a function of time and distance to release site. (Sumi, 2014) (Csóka, 2015)

We found serum ATP levels clearly elevated in septic patients when compared to healthy controls, suggesting that sepsis is a state of enhanced *ATPergic tonus*, at least in an early overly inflammatory phase. Besides elevated ATP, we have found augmented nucleotidase activity in septic serum, which we can speculate having a protective effect of lowering ATP levels on early sepsis, balancing inflammation.

As our patients serum ATP levels averaged around 28 μM , in the range of P2Y2 receptors activation (Junger, 2011), we assume active P2Y2 agonism in circulating neutrophils of septic patients.

Neutrophils engagement in immune response depends on purinergic signaling, specially chemotaxy. Chen and others proposed, in 2006 that neutrophils depend on eATP and P2Y2/A3 receptors in an autocrine fashion to migrate through a chemotatic gradient.

The autocrine signaling circuit was further confirmed and developed, and consists on ATP exocytosis by pannexin channels at the cell pole that faces the chemotatic signal, P2 agonism, pericellular ATP hydrolysis to generate ADO, A3 and A2a agonism. In this model, P2Y2 receptors locate on the leading edge, while A2a receptors locate in the trailing edge. Cell polarization, chemotaxy and directional orientation towards a chemotatic signal depend on ATP - P2Y2 - CD39 - CD73 - ADO - A2a/A3 autocrine circuit. (Kukulski, 2007) (Inoue, 2007) (Kukulski, 2009) (McDonnald, 2010) (Bao 2013)

We observed P2Y2 and A2a augmented expression in circulating neutrophils during septic response, as compared to non-septic controls. Together with elevated ATP and nucleotidase activity, our findings fit in the proposed model of purinergic autocrine circuit that enables neutrophil chemotaxy. Several pre-clinical studies report ATP as a driver to neutrophils chemotaxy. Interestingly, tissue infiltration also depends on endotelial P2Y2 receptors. Finally, in models of toxin-induced acute lung injury, either autocrine and paracrine ATP signaling disruption attenuated lung neutrophil infiltration and IL release. (Kukulski, 2010) (Inoue, 2007) (Monção-Ribeiro, 2011)

Collectively, these findings suggest that neutrophil chemotaxy and tissue infiltration can be controlled by pharmacological control of serum ATP concentration.

Besides chemotaxy, oxidative burst, phagocytosis, degranulation and pathogen clearance also depend on ATP-P2 autocrine circuit. ATP-P2X7 interaction strongly activates NLRP3 inflammasome and controls IL-1 β liberation, but the production of inflammasome-independent interleukins is also promoted. (Chen 2010), (McDonald, 2010)(Kukulski, 2011) (Bao 2014) (Santana, 2015) (Karmakar, 2016)

Differently from P2Y2, we assume P2X7 receptors were inactive or minimally active in circulating neutrophils. The measured serum ATP in septic patients was below the threshold for P2X7 activation ($EC_{50} > 100 \mu M$), and we also found P2X7 expression to be unchanged in circulating neutrophils of septic and non-septic subjects. Since P2X7 receptors are related to massive IL-1 β release, oxidative burst and phagocytosis, remaining inactive in circulation is probably protective.

In sites of injury and inflammation, eATP reaches hundreds micromolar or even milimolar levels (Burnstock, 2010), high enough to full activation of P2X7 receptors. Released ATP distributes to adjacent areas, and eventually a gradient of ATP concentration from the injured site to systemic circulation is created. Serum ATP levels thus should be in the range to sensitize P2Y2 and prompt chemotaxy and tissue infiltration through the ATP gradient, but without P2X7 activation.

When the cell reaches closer to damage/infection site, higher ATP levels activate P2X7 receptors, then amplifying cell activation, interleukin release, phagocytosis, oxidative burst and pathogen clearance, but also causing additional tissue damage.

As collateral tissue damage causes more ATP release, this model drives us to a paracrine ATPergic feed-back loop (tissue damage - eATP - P2 - tissue damage) that in theory may become largely indifferent to other modulatory approaches.

Importantly, monocytes and macrophages functions also appear to obey to the described autocrine and paracrine ATPergic signaling circuits similarly to neutrophils. (Kukulski, 2007) (Elliot, 2007) Kronlage, 2010) (Sakaki, 2013) (Gicqiel, 2015) (Cohen, 2016)

A possible weakness of our data is great intergroup variability in age and gender. However, there were no previous evidences that purinergic receptors expression, serum ATP concentration and ectonucleotidases activity varies with age and group.

A challenge in developing a immune modulatory therapy aiming to restore immune homeostasis is that sepsis is a product of multiple and redundant inflammatory pathways. (Marshall, 2014) A therapeutic approach based on ATPergic signaling could have the advantage of addressing simultaneously multiple pathways of inflammation in neutrophils, lymphocytes, monocytes and macrophages, as these cells depend on purinergic signaling, in general, but in particular to ATPergic signaling to mount a response to infection. From a clinical stand point, *ATPergic tonus* could be pharmacologically reduced or augmented to fine-tune immune response throughout sepsis course, possibly based on repeated ATP/nucleotidase measurements coupled with broader evaluation of inflammatory/immunosuppressed state.

Finally, in theory, serum ATP levels relate with intensity of cellular activation and tissue damage, allowing to discriminate between sepsis and uncomplicated infection, and, in septic patients, to gauge the intensity of inflammatory response and tissue injury. Our study was not designed for testing this hypothesis, but our findings support further testing serum ATP concentration role in the diagnosis and staging of sepsis.

Conclusion

Purinergic signaling provides a pro and anti-inflammatory framework closely related to sepsis pathophysiology, in an autocrine fashion, controlling immune cell responses, and in a paracrine fashion, driving systemic inflammation. We have demonstrated that human sepsis displays some features of purinergic signaling involvement, in line with previous findings from animal models and *in vitro* studies. We speculate that ATPergic signaling could base diagnostic and therapeutic approaches in sepsis.

Acknowledgements

This study was supported by the Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Processo 310846/2014-5), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul. A.P.S. Bertoni was recipient of Capes post-doc fellowship; M. Dal Prá and L.L.P. da Cruz were recipients of FAPERGS/PROBIC fellowship; N.E. Gelsleichter

was recipient of CNPq/PIBIC fellowship; J.H. Azambuja was recipient of UFCSPA institucional fellowship.

References

BAO, YI et al., Pannexin 1 Channels Link Chemoattractant Receptor Signaling to Local Excitation and Global Inhibition Responses at the Front and Back of Polarized Neutrophils. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 289, n. 31, pp. 22.850, 2013

BAO, YI et al., Mitochondria Regulate Neutrophil Activation by Generating ATP for Autocrine Purinergic Signaling. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 289, n. 39, pp. 26794-26803, 2014.

BRAGANHOL, ELIZANDRA et al., Nucleotide receptors control IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 secretions as well as proliferation in human glioma cells. **Biochimica Biophysica Acta**. v.1852, n. 1 pp. 120-30, 2015

BURNSTOCK, GEOFFREY. P2X ion channel receptors and inflammation. **Purinergic Signaling**. v.12, pp-59-67, 2016

CEKIC, CAGLAR et al., Purinergic regulation of the immune system. **Nature Reviews Immunology**. v.16, n.3, pp. 177-92., 2016

CHEN, YU et al., ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. **Science**. v. 314, p. 1792-1795, 2006.

CHEN, YU et al., Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation. **Science signaling**. v.3, n. 125, pp. rae45, 2010

COHEN, HEATHER B et al., TLR stimulation initiates a CD39-based autoregulatory mechanism that limits macrophage inflammatory responses. **Blood**. v. 122, n. 11, pp. 1935-1946, 2016

CSÓKA, BALAZS et al., Extracellular ATP protects against sepsis through macrophage P2X7 purinergic receptors by enhancing intracellular bacterial killing. **FASEB Journal**. v. 29. n. 9, pp. 3626-3637, 2015

ELLIOTT, MICHAEL R et al., Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. **Nature**, v. 461, n. 7261, pp. 282-286, 2009

FLEISCHMANN, CAROLYNN. et al., Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 193, n.3, pp.259-72, 2016

GICQUEL, THOMAS et al., IL-1 b production is dependent of the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. **FASEB Journal**. v. 29, n.10, pp. 4162-73, 2015

INOUE, YOSHIAKI et al., A3 and P2Y2 receptors control the recruitment of neutrophils to the lungs in a mouse model of sepsis. **Shock**. v. 30, n.2, pp. 173-177, 2008.

JUNGER, WOLFGANG G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews Immunology**. v.11, n.3, pp. 201-12, 2011

KARMAKAR, MAUSITA et al., Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1b secretion in response to ATP. **Nature Communications**. v.7, pp. 10555, 2016

KRONLAGE, MORITZ et al., Autocrine Purinergic Receptor Signaling Is Essential for Macrophage Chemotaxis. **Science Signaling**. v. 3, n. 132, pp. 1-10, 2010.

KUKULSKI, FILIP et al., Endothelial P2Y2 receptor regulates LPS-induced neutrophil transendothelial migration in vitro. **Molecular immunology**, v. 47, n. 5, pp. 991-9, 2010

KUKULSKI, FILIP et al., Extracellular ATP and P2 receptors are required for IL-8 to induce neutrophil migration. **Cytokine**, v. 46, p.2, pp. 166-70, 2009

KUKULSKI, FILIP et al., Extracellular nucleotides mediate LPs-induced neutrophil migration in vitro and in vivo. **Journal Of Leukocyte Biology** v. 81, n. 5, pp. 1269-75, 2007

KUKULSKI, FILIP et al., NTPDase1 controls IL-8 production by human neutrophils. **Journal of immunology**. v. 187, n. 2, pp. 644-53, 2011

LIVAK, K et al., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method **Methods**. v.25, pp. 402-408, 2001

MARSHALL, JOHN C., Why have clinical trials in sepsis failed?. **Trends in Molecular Medicine**. v.20, n.4, pp. 195-203, 2014

MCDONALD, BRAEDON et al., Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. **Science**. v. 330, n. 6002, pp. 323-66, 2010

MONÇÃO-RIBEIRO, LEONARDO C et al., Lipopolysaccharide-induced lung injury: role of P2X7 receptor. **Respiratory physiology & neurobiology**. v. 179, pp. 314-325, 2011

OH, H. et al., Neutrophil Isolation Protocol. **Journal of Visualized Experiments**. v.23, n. 17 pp. 745, 2008

OSES, JEAN P. et al., Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. **Life Sciences**. v.74, pp. 3275-3284., 2004

SAKAKI, HAYATO et al., Autocrine Regulation of Macrophage Activation via Exocytosis of ATP and Activation of P2Y11 Receptor. **PLoS ONE**. v. 8, n. 4, e59778, 2013

SANTANA, PATRICIA TEXEIRA et al., The P2X7 Receptor Contributes to the Development of the Exacerbated Inflammatory Response Associated with Sepsis. **Journal of innate immunity**. v. 7, n. 4, pp. 417-27, 2015

SINGER, MERVYN, ET AL., The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Journal of American Medical Association.** v. 315, n. 8, pp. 801-810, 2016

SUMI, YUKA et al., Plasma ATP is required for neutrophil activation in a mouse sepsis model. **Shock.** v. 42, n.2. pp-124-5, 2014

VINCENT, JEAN LOUIS et al., Assessment of the worldwide burden of critical illness: the Intensive Care Over Nations (ICON) audit. **Lancet Respiratory Medicine.** v.2, pp. 380-386, 2014.

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Product length (bp)
A _{2a}	ATCGCCATTGACCGCTACAT	AATGATGCCCTTAGCCCTCG	84
P2X ₇	CCATCGAGGCAGTGGAAGAG	GCCGGGGAAGTCGATATTGT	95
P2Y ₂	CAGGCACGTGGGTCTCTG	CCAGCATTTTTCTGGGCAGG	146
P2Y ₆	CATTTGACGGGTTCGCCTC	AGAGGTCTTGTTATCTGCGCC	91
TBP	GCATCACTGTTTCTTGGCGT	CGCTGGAAC TCGTCTCACTA	112

Table 1. Primer pairs for qPCR and product size.

	Septic	Non-septic	Healthy
Male gender (%)	4 (40%)	6 (60%)	2 (14%)
Age, mean (s.d.)	59.9 (16.6)	70.5 (8.8)	26.1 (6.5)
Comorbidities			
Cancer	2	2	-
Type II Diabetes	3	5	-
Arterial hypertension	5	7	-
Coronary disease	2	2	-
Chronic kidney disease	0	1	-
Gout	0	1	-
Chronic pulmonary obstructive disease	2	3	-
Hypothyroidism	1	1	-
Morbid obesity	1	1	-
Hepatic cirrhosis	0	1	-

Table 2. Patients and controls demographics and comorbidities. s.d., standard deviation.

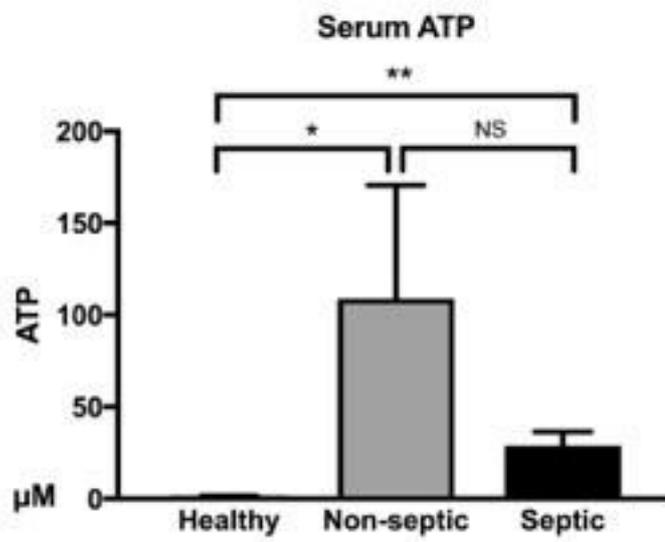
Legend to Figures

Figure 1. ATP is differentially secreted to blood serum of healthy, ward non-septic and septic patients. Blood samples were collected from experimental groups and the serum ATP content was evaluated by luciferin-luciferase system as described in material and methods. Values represent the mean \pm SE from healthy (n=11), ward non-septic (n=7) and septic patients (n=11). Data were analyzed by Mann-Whitney for intergroup comparison. Statistical difference were considered when $P < 0.05$.

Figure 2. Serum nucleotidase activities are modulated by inflammatory conditions associated or not to sepsis. Blood samples were collected from healthy, ward non-septic and septic patients and the ATP/ADP/AMPase and adenosine deaminase (ADA) activities were evaluated in serum as described in material and methods. Values represent the mean \pm SE from healthy (n=5), ward non-septic (n=13) and septic patients (n=11). Data were analyzed by ANOVA followed by post hoc comparisons (Tukey-Kramer test). Statistical difference were considered when $P < 0.05$.

Figure 3. Purinergic receptor A2a and P2Y2 mRNA expression is upregulated in neutrophils from septic patients. Neutrophils were isolated from blood samples of healthy, ward non-septic and septic groups and processed for A2a, P2X7, P2Y2 and P2Y6 mRNA expression analysis by qPCR as described in material and methods. Results were analyzed by the $2^{-\Delta/\Delta CT}$ method. Values represent the mean \pm SE from healthy (n=5), ward non-septic (n=7) and septic patients (n=10). Data were analyzed by Mann-Whitney for intergroup comparison. Statistical difference were considered when $P < 0.05$.

Figure 1



** p=<0,001
* p=0,033
NS= not significant

Figure 2

Nucleotidase activity

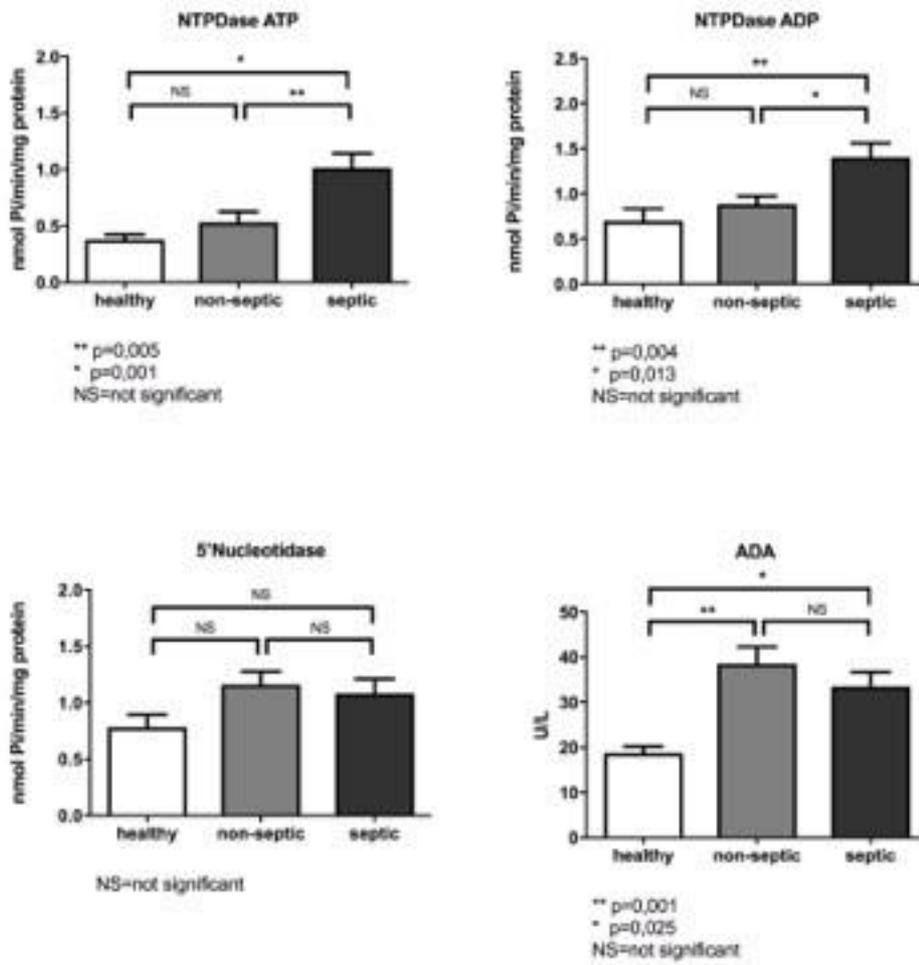
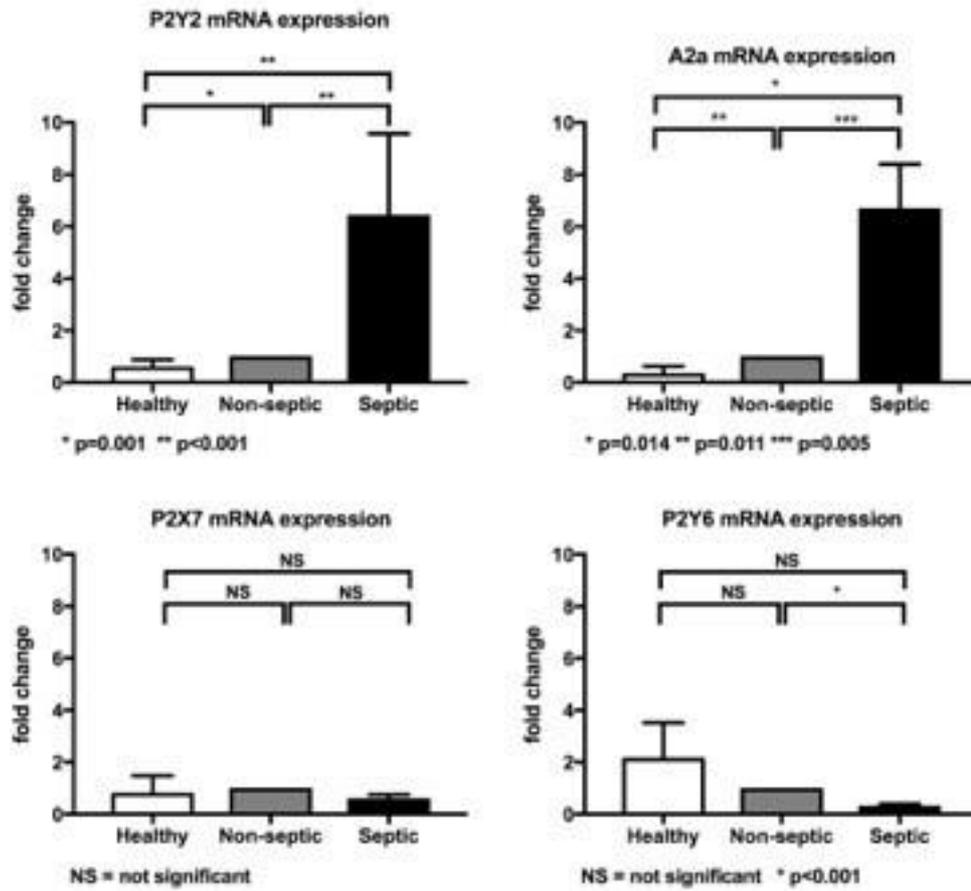


Figure 3

Purinergic receptors relative expression in human neutrophils



Parte IV

5. Conclusão

A sinalização purinérgica oferece mecanismos de modulação pró e anti-inflamatórios intimamente relacionados com a fisiopatologia da sepse. Em um contexto teórico em que a sepse é causada por inflamação desregulada, e o paradigma de tratamento é a busca da homeostase imune, a sinalização purinérgica, em especial a sinalização pelo ATP, tem um interessante potencial na busca por terapias efetivas.

Neste trabalho nós demonstramos que alguns elementos da sinalização purinérgica estão ativos na sepse humana. Começamos a responder algumas perguntas, as mais básicas, e vimos que de fato a concentração de ATP e a atividade das nucleotidases estão elevadas no soro de pacientes sépticos, e que seus neutrófilos circulantes expressam com mais intensidade os receptores purinérgicos.

Um saudável ceticismo nos faz reconhecer que as tentativas de modular a inflamação na sepse parecem fadadas ao fracasso. Somente uma melhor descrição dos fenômenos biológicos envolvidos poderá embasar terapias mais promissoras. Esperamos no futuro poder contribuir com este processo.

6. Submissão de Artigo

Critical Care Medicine

Journal Home | LOGIN | HELP | SEARCH | UPDATE MY INFORMATION | JOURNAL OVERVIEW
ABOUT | CONTACT US | CONTACT A MANAGER | CONTACT US FOR ADVERTISING

Editorial Manager

Submissions Being Processed for Author Rafael Silva Leite, M.D.

Page: 1 of 1 (1 total submission(s))

Showing 1/10 results per page

#	Author	Manuscript Number A/T	Title A/T	Initial Date Submitted A/T	Status Date A/T
1	View Submission Author Status Send E-mail		Algebra Control of Inverse (Inverses in Spline)	Mar 2 2017 9:48:55 (GMT)	Mar 2 2017 9:48:55 (GMT)

Page: 1 of 1 (1 total submission(s))

Showing 1/10 results per page

[Go to Page 1 of 1](#)

6. Referências Bibliográficas

ALVES-FILHO, J. C. et al., Neutrophil paralysis in sepsis. **Shock** v. 34, sup.1, pp.15–21, 2010.

ANGUS, DEREK E VAN DER POLL, TOM. Severe sepsis and septic shock. **New England Journal of Medicine**. v.369, n.21, pp:2063, 2013

ASSUNÇÃO, MURILO et al., Survey on physician's knowledge of sepsis. **Journal of Critical Care**. v. 25, pp. 545–552, 2010

BAO, YI et al.,. Mitochondria Regulate Neutrophil Activation by Generating ATP for Autocrine Purinergic Signaling. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 289, n. 39, pp. 26794-26803, 2014.

BAO, YI et al., Pannexin 1 Channels Link Chemoattractant Receptor Signaling to Local Excitation and Global Inhibition Responses at the Front and Back of Polarized Neutrophils. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 289, n. 31, pp. 22.850, 2013

BONE, ROBERT C. et al, A controlled trial of high-dose methyl-prednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. **New England Journal of Medicine**. v. 317 pp. 653-658, 1987.

BONE, ROBERT C. et al., Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest**. v. 101, n.6, pp. 1644-55, 1992

BOOMER JONHATAN et al., Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure. **Journal of the American Medical Association**.;v.306, n.23, pp:2594-2605, 2011

BOOMER, JONATHAN S et al., The changing immune system in sepsis. **Virulence**. v.5, n.1, 45-56, 2014

BURNSTOCK, GEOFFREY et al., Purinergic signalling and immune cells. **Purinergic Signaling**. v.10, n.4, 529-64, 2014

BURNSTOCK, GEOFFREY. P2X ion channel receptors and inflammation. **Purinergic Signaling**. v.12, pp-59-67, 2016

CAUWELS, A et al., Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality. **Cell Death and Disease**. v. 5 n. 3. pp. e1102-7, 2014

CEKIC, CAGLAR et al., Purinergic regulation of the immune system. **Nature Reviews Immunology**. v.16, n.3, pp. 177-92., 2016

CHEADLE, W. G. et al. Lymphocyte subset responses to trauma and sepsis. **Journal of Trauma** v.35, pp. 844–849, 1993

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

CHELAZZI et al. Glycocalyx and sepsis-induced alterations in vascular permeability. **Critical Care** v.19:26, DOI: 10.1186/s13054-015-0741-z, 2015

CHEN, YU et al., ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. **Science**. v. 314, p. 1792-1795, 2006.

CHEN, YU et al., Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation. **Science signaling**. v.3, n. 125, pp. rae45, 2010

COHEN, HEATHER B et al., TLR stimulation initiates a CD39-based autoregulatory mechanism that limits macrophage inflammatory responses. **Blood**. v. 122, n. 11, pp. 1935-1946, 2016

COHEN, JONHATAN, et al., Sepsis: a roadmap for future research **Lancet Infectious Diseases**. v.15, pp. 581–614, 2015

CSÓKA, BALAZS et al., CD39 improves survival in microbial sepsis by attenuating systemic inflammation. **FASEB Journal**. v. 29, n.1, pp. 25-36, 2015

CSÓKA, BALAZC et al., Extracellular ATP protects against sepsis through macrophage P2X7 purinergic receptors by enhancing intracellular bacterial killing. **FASEB Journal**. v. 29. n. 9, pp. 3626-3637, 2015

DE OLIVEIRA, SOFIA et al., Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. **Nature reviews Immunology**. v.16, n.6, pp. 378-391, 2016

DI VIRGILIO, FRANCESCO. Purinergic signaling in the immune system. **Autonomic Neuroscience**. v.117, pp.117-123. 2015

DREWRY AM, et al., Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. **Shock** v.42, pp.383–391, 2014

ELLIOTT, MICHAEL R et al., Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. **Nature**, v. 461, n. 7261, pp. 282-286, 2009

FINK, MITCHELL P. Animal models of sepsis. **Virulence**. v.5, n.1, pp. 143-53

FLEISCHMANN, CAROLYNN. et al., Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 193, n.3, pp.259-72, 2016

FRIEBE, DANIELA et al., Purinergic signaling on leukocytes infiltrating the LPS-injured lung. **PloS one** v. 9, n.4, pp .e95382, 2014

FUNK DJ, et al., Sepsis and septic shock: a history. **Critical Care Clinics**. v. 25, n.1, pp.83-101, 2009

GASSART, AUDE DE et al., Pyroptosis: Caspase-11 Unlocks the Gates of Death **Immunity** v.43, n.5, pp:835-7, 2015

GICQUEL, THOMAS et al., IL-1 b production is dependent of the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. **FASEB Journal**. v. 29, n.10, pp. 4162-73, 2015

GIRARDOT, THIBAUT et al., Apoptosis-induced lymphopenia in sepsis and other severe injuries. **Apoptosis** DOI 10.1007/s10495-016-1325-3, 2016

GROL, MATTHEW W et al., P2 receptor networks regulate signaling duration over a wide dynamic range of ATP concentrations. **Journal of Cell Science**. v. 116, n. 16, pp. 3615, 2013

HE, YUAN et al., TLR Agonists Stimulate Nlrp3-Dependent IL-1 β Production Independently of the Purinergic P2X7 Receptor in Dendritic Cells and In Vivo. **Journal of Immunology**. v. 190, n. 1, pp. 2-8, 2012

HOTCHKISS, RICHARD S et al., Sepsis-induced immunosuppression : from cellular dysfunctions to immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**. v.13, n. 12, pp-862-8754, 2013

HYNNINEN, MARJA et al., predictive value of monocyte histocompatibility leukocyte antigen-DR expression and plasma leukocyte interleukin-4 and -10 levels in critically ill patients with sepsis **Shock** Vol. 20, No. 1, pp. 1–4, 2003

IDZKO, MARCO et al., Nucleotide signalling during inflammation. **Nature**. v. 509, n.7500, pp.310-317, 2014

INOUE, YOSHIAKI et al., A3 and P2Y2 receptors control the recruitment of neutrophils to the lungs in a mouse model of sepsis. **Shock**. v. 30, n.2, pp. 173-177, 2008.

JACOB, FENILA et al., Purinergic signaling in inflammatory cells : P2 receptor expression , functional effects and modulation of inflammatory responses. **Purinergic Signaling**. v9. pp. 285-306, 2013

JUNGER, WOLFGANG G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews Immunology**. v.11, n.3, pp. 201-12, 2011

KARMAKAR, MAUSITA et al., Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP. **Nature Communications**. v.7, pp. 10555, 2016

KOCH, ROBERT. Die Aetiologie der tuberculose. **Berl. Klin. Wochenschr**. v. 19, 221e230, 1882

KRONLAGE, MORITZ et al., Autocrine Purinergic Receptor Signaling Is Essential for Macrophage Chemotaxis. **Science Signaling**. v. 3, n. 132, pp. 1-10, 2010.

KUKULSKI, FILIP et al., Endothelial P2Y2 receptor regulates LPS-induced neutrophil transendothelial migration in vitro. **Molecular immunology**, v. 47, n. 5, pp. 991-9, 2010

KUKULSKI, FILIP et al., Extracellular ATP and P2 receptors are required for IL-8 to induce neutrophil migration. **Cytokine**, v. 46, p.2, pp. 166-70, 2009

KUKULSKI, FILIP et al., Extracellular nucleotides mediate LPS-induced neutrophil migration in vitro and in vivo. **Journal Of Leukocyte Biology** v. 81, n. 5, pp. 1269-75, 2007

KUKULSKI, FILIP et al., NTPDase1 controls IL-8 production by human neutrophils. **Journal of immunology**. v. 187, n. 2, pp. 644-53, 2011

KUKULSKI, FILIP et al., The P2 receptor antagonist PPADS abrogates LPS-induced neutrophil migration in the murine air pouch via inhibition of MIP-2 and KC production. **Molecular immunology**. v. 47, n. 4, pp. 833-39, 2010

LATZ, EICKE et al., Activation and regulation of the inflammasomes. **Nature Reviews Immunology**. v. 13, n. 6, pp. 397-411, 2013

LEDDEROSE, CAROLA et al., Mitochondrial Dysfunction, Depleted Purinergic Signaling, and Defective T Cell Vigilance and Immune Defense. **Journal of Infectious Diseases**. v. 213, n. 3, pp. 456-464, 2016.

LEDDEROSE, CAROLA, et al., Purinergic Signaling and the Immune Response in Sepsis: A Review. **Clinical Therapeutics**. v. 38, n. 5, pp. 1054-1065, 2016

LÉPINE, S et al., ATP-induced apoptosis of thymocytes is mediated by activation of P2 X 7 receptor and involves de novo ceramide synthesis and mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2006 v.1761, n.1, pp: 73-82, 2005

LEVI, MARCEL, Antithrombin in sepsis revisited **Critical Care**, v.9, pp: 624-625, 2005

LEVY, MITCHELL M. et al. International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Intensive Care Medicine**. v. 29, n.4, pp:530-538, 2003

LISTER, JOSEPH. Illustrations of the antiseptic system of treatment in surgery. **Lancet**. v.90, pp. 668–69, 1867

MARSHALL, JOHN C., Sepsis: rethinking the approach to clinical research. **Journal of Leukocyte Biology**. v.83, n.3, pp.471-82, 2008

MARSHALL, JOHN C., Why have clinical trials in sepsis failed?. **Trends in Molecular Medicine**. v.20, n.4, pp. 195-203, 2014

MARTIN et al. The Endothelial Glycocalyx: New Diagnostic and Therapeutic Approaches in Sepsis **BioMed Research International** V. 2016, Article ID 3758278

MCDONALD, BRAEDON et al., Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. **Science**. v. 330, n. 6002, pp. 323-66, 2010

MONÇÃO-RIBEIRO, LEONARDO C et al., Lipopolysaccharide-induced lung injury: role of P2X7 receptor. **Respiratory physiology & neurobiology**. v. 179, pp. 314-325, 2011

OPAL, STEVEN M. et al., Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. **Journal of the American Medical Association**. v.309, n.11, pp.1154-62, 2013

OSUCHOWSKI, MF et al., Abandon the mouse research ship? Not just yet! **Shock**. v.41, n.6 pp.463-75. 2014

PANACEK, E.A. et al. Efficacy and safety of the monoclonal anti- TNF antibody F(ab)2 fragment in patients with severe sepsis stratified by IL-6 level. **Critical Care Medicine**. v. 32, 2173–2182, 2004

PETERS, E. et al. Study protocol for a multicentre randomised controlled trial: Safety, Tolerability, efficacy and quality of life Of a human recombinant alkaline Phosphatase in patients with sepsis-associated Acute Kidney Injury (STOP-AKI). **BMJ Open** DOI:10.1136/bmjopen-2016- 012371, 2016

REY, ADRIANA et al., Knock-out mice reveal the contributions of P2Y and P2X receptors to nucleotide-induced Ca²⁺ signaling. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 281, n. 46, pp. 35147–35155, 2006.

SAKAKI, HAYATO et al., Autocrine Regulation of Macrophage Activation via Exocytosis of ATP and Activation of P2Y₁₁ Receptor. **PLoS ONE**. v. 8, n. 4, e59778, 2013

SANTANA, PATRICIA TEXEIRA et al., The P2X₇ Receptor Contributes to the Development of the Exacerbated Inflammatory Response Associated with Sepsis. **Journal of innate immunity**. v. 7, n. 4, pp. 417-27, 2015

SCHENCK, URSULA et al., ATP Inhibits the Generation and Function of Regulatory T Cells Through the Activation of Purinergic P2X Receptors. **Science Signaling**. v.4, n. 162, pp 1-12, 2011

SCHENCK, URSULA et al., Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. **Science Signaling**. v. 1, n. 39, pp. 1-14

SHAKOORY et al., Interleukin-1 Receptor Blockade Is Associated With Reduced Mortality in Sepsis Patients With Features of Macrophage Activation Syndrome: Reanalysis of a Prior Phase III Trial **Critical Care Medicine**. v.44, n.2, pp.275-81, 2016

SHARAWY, N. et al., Vasoplegia in septic shock: Do we really fight the right enemy? **Journal of Critical Care** v. 29, pp. 83–87, 2014

SHOJI, KF et Al., Pannexin1 channels act downstream of P2X₇ receptors in ATP-induced murine T-cell death. **Channels**. v.8, n.2 pp:142-56, 2014

SINGER, MERVYN, ET AL., The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Journal of American Medical Association**. v. 315, n. 8, pp. 801-810, 2016

SINGER, MERVYN, The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. **Virulence**. v.5, n.1, 66-72, 2014

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

STRAND et al., Nitric oxide indices in human septic shock **Critical Care Medicine**.; v.28, pp:2779 –2785, 2000

SUMI, YUKA et al., Plasma ATP is required for neutrophil activation in a mouse sepsis model. **Shock**. v. 42, n.2. pp-124-5, 2014

TSUKIMOTO, MITSUTOSHI et al., Blockade of murine T cell activation by antagonists of P2Y 6 and P2X 7 receptors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 384, n. 4, pp. 512-18.

UNSINGER, J. et al. Interleukin-7 ameliorates immune dysfunction and improves survival in a 2-hit model of fungal sepsis. **Journal of Infectious Diseases**. v.206, pp.606–616, 2012

VENET, F. et al. Increased percentage of CD4+ CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+ CD25– lymphocytes. **Critical Care Medicine**. v.32, pp.2329–2331, 2004.

VINCENT, JEAN LOUIS et al., Assessment of the worldwide burden of critical illness: the Intensive Care Over Nations (ICON) audit. **Lancet Respiratory Medicine**. v.2, pp. 380-386, 2014.

VINCENT, JEAN LOUIS et al., Sepsis definitions: time for change. **Lancet**. v. 381, n.9868, pp.774–775, 2013.

WALLACH, DAVID et al., Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules **Science**. v. 352 n. 6281, aaf2154. DOI: 10.1126/science.aaf2154, 2016

WANG, SHUANG et al., Blockage of P2X7 attenuates acute lung injury in mice by inhibiting NLRP3 inflammasome. **International immunopharmacology**. v. 27, n. 1, pp. 38-45, 2015

WIERSINGA, WILLEN J. et al., Host innate immune responses to sepsis **Virulence**. v.5, n.1, pp. 36–44, 2014

WOEHRLE, TOBIAS et al., Pannexin-1 hemichannel – mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. **Blood**. v. 116, n. 18, pp. 3475-3485, 2010

YIP, LINDA et al., Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X 7 receptors. **FASEB Journal**, v. 23, pp. 1685-1693, 2009

ZAREK, PAUL E. et al., A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. **Blood** v. 111, n. 1, pp. 251-260, 2007

ZHAO, HAILIN et al., The Role of Extracellular Adenosine Triphosphate in Ischemic Organ Injury. **Critical Care Medicine**. v.44, pp-1000-1012, 2016.