

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE E
MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**O PAPEL DE ROS (ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO) NA
EXACERBAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA
SEPSE**

YANAIHARA PINCHEMEL AMORIM DE OLIVEIRA

SALVADOR-BA

2011

**Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**O PAPEL DE ROS (ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO)
NA EXACERBAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA
SEPSE**

YANAIHARA PINCHEMEL AMORIM DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Alberto Augusto Noronha Dutra

Co-orientador: Dr. Ricardo David Couto

SALVADOR-BA

2011

Dedico este trabalho,

*Aos meus queridos pais, Ruy e Suelly,
que por uma vida de dedicação, amor e
trabalho sempre possibilitaram a seus
filhos a oportunidade de realizar sonhos e
conquistas...*

*...e aos meus irmãos, Érica e Víctor,
companheiros inseparáveis...*

AGRADECIMENTOS

Fruto de muito estudo, dedicação e persistência, este trabalho contou com a colaboração e apoio de muitas pessoas as quais dedico os meus agradecimentos especiais:

Ao querido Dr. Alberto Dutra, meu orientador, pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de um cientista, pelas idéias, incansáveis ensinamentos, úteis lições de vida e principalmente por me ensinar a aprender.

Ao querido professor Ricardo Couto, meu co-orientador, pela minha introdução na área científica, confiança e disposição de sempre ajudar.

Ao Dr. Lain Pontes pelo exemplo de profissional, de ser humano, por suas sugestões e correções sempre pertinentes.

À equipe do Hospital Ana Neri e HUPES pelo apoio e colaboração.

Aos pacientes objetivo maior de toda atividade científica.

Ao colega e amigo Cláudio Figueira pela paciência, prestatividade e discussões em relação à microscopia.

À Viviane Junqueira por ter sido tão acolhedora nos meus primeiros passos no LPBI.

À Luciana Aragão por sempre manter a ordem na “bancada 05” e pela ajuda nas análises de citometria de fluxo.

À Thayna Meirelles pela generosidade em transmitir seus conhecimentos.

Ao colega Felipe Miranda pelas proveitosas e interessantes discussões sobre o NO.

Ao amigo David Garrido pela energia contagiante, ajuda e companhia nos experimentos.

Aos colegas Pablo Oliveira, Thassila Pitanga, Pilar Veras, Virgínia Silva pela agradável convivência durante esses anos.

À Isabela Navarro, Andréa Cunha e Cíntia Araújo pela atenção e ajuda nas culturas de células.

À Cristiane, Bianca e Nayara pelo carinho, confiança e palavras de apoio.

Ao colega Allan Araújo pela ajuda no processamento das amostras.

Aos colegas do LPBI 1 e 2 pelo convívio diário.

A Everton Batista e Marcos Leal pela ajuda na etapa final do trabalho.

À Tâmara Nogueira e Flávia Lima pela amizade sólida construída durante esse tempo de mestrado.

A Mento, por todo carinho, amor, companheirismo, compreensão e imenso apoio nas inúmeras revisões desta dissertação.

À tia Helma Pinchemel, mistura de tia e referência profissional, pelo afeto e incentivo.

A Sérgio Vasconcelos pelo trabalho na esterilização.

À Elivani de Jesus pelo auxílio técnico.

À Flávia Paixão pela competência administrativa do LPBI.

À D.Maria José pela boa vontade em manter o ambiente confortável.

À FAPESB, pelo apoio financeiro.

À FIOCRUZ, pelas oportunidades dadas a mim.

E finalmente a Deus, que por sua presença, luz e força sempre me abençoa e me protege...

*As idéias são mais importantes do que
experimentos...*

John Martin

RESUMO

Sepse é uma das doenças com a maior causa de morbidade para as quais não existe tratamento efetivo capaz de mudar o desfecho. O tratamento da sepse grave tem um custo alto devido ao fato de, geralmente, ser tratada em Unidades de Terapia Intensiva com fluídos intravenosos e antibióticos caros. Neste trabalho nós estudamos as primeiras etapas desta patologia com o foco na produção de espécies reativas de oxigênio deletérias pelas células inflamatórias circulantes. Nós encontramos usando microscopia eletrônica de varredura e análise de esfregaço de sangue a presença de eritrócitos morfologicamente alterados com a predominância de equinócitos. O mesmo efeito pode ser observado quando o sangue de voluntários sadios foram submetidos ao estresse oxidativo por adição direta de radicais livres oxidantes, principalmente peróxido de nitrito ou através da redução dos antioxidantes intracelulares, neste caso, o mais importante, os sistemas dependentes de glutathione. Como macrófagos removem eritrócitos modificados, foi utilizada a linhagem celular de macrófagos J774 e observamos a adesão imediata e iniciação do processo de fagocitose por essas células. Essas células iniciam a produção de superóxido quando em contato com eritrócitos modificados *in vitro* ou eritrócitos de pacientes sépticos. Nós também medimos a produção de ROS em sangue total pelo contador de fótons, usando como inibidores a superóxido dismutase para superóxido, azida para mieloperoxidase, desferroxamina e hidralazina para peróxido de nitrito, todas essas espécies estiveram presentes. O valor medido no sangue dos pacientes sépticos foi aumentado de 20 a 1000 vezes em relação aos voluntários. Quando usamos eritrócitos de pacientes sépticos com neutrófilos isolados observamos a produção de ROS durante a adesão dessas células com os neutrófilos. Esses dados nos permite sugerir que durante a sepse o primeiro contato com patógenos inicia uma produção de ROS que modifica oxidativamente os eritrócitos por um mecanismo de feedback positivo o qual amplifica a produção de espécies oxidativas para além da presença desses patógenos causando danos nos vasos e órgãos.

Palavras-chave: Sepse • inflamação • microcirculação • peróxido de nitrito • eritrócitos modificados oxidativamente

ABSTRACT

Sepsis is one of the illnesses with the highest cause of morbidity for which no effective treatment exists capable of changing the outcome. Severe sepsis treatment has a high care cost due to the fact that it is usually treated in the intensive care unit with intravenous fluids and expensive antibiotics. In this submission we study the earliest stages of this pathology with the focus in the deleterious production of Reactive Oxygen Species by the inflammatory circulating cells. We found using both scanning electron microscopy and analysis of blood smear the ubiquitous presence of red blood cells (RBC) morphologically modified, with the predominance of echinocytes. The same effects could be observed when the blood of healthy volunteers were subject to oxidative stress, either by direct addition of free radicals oxidants, mainly peroxynitrite, or by lowering the intracellular antioxidants, in this case arguably the more important, the GSH dependent systems. As macrophage removes modified RBC we used the macrophage cell line j774 and could see the immediate attachment and initiation of phagocytosis by these cells. These cells initiate a production of superoxide when in contact with in vitro modified or sepsis patients RBCs. We also measure total blood ROS production by photon counting, using as inhibitors SOD for superoxide, azide for myeloperoxidase and desferrioxamine and hydralazine for peroxynitrite; all these species were present. The amount measured in the blood of patients was increased from 20 to 1000 times in relation to controls. When we used sepsis patients RBC with isolated neutrophils again we saw attachment of these cells to the PMN a production of ROS. These data allow us to suggest that during sepsis the initial contact with pathogens initiate a production of ROS that modifies oxidatively RBC that then by a mechanism of positive feedback amplifies the production beyond the presence of the pathogens and causes vessels and organs damage that this species are known to induce.

Keywords: Sepsis • inflammation • microcirculation • peroxynitrite • erythrocytes modified oxidative

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Interação do ONOO^- com componentes do eritrócito	24
Figura 2	Oxidação e regeneração da GSH	27
Figura 3	Autoxidação do heme ferroso eritrocitário	30
Figura 4	Reação de Fenton	31
Figura 5	Metabolismo dos eritrócitos	32
Figura 6	Comparação da sensibilidade dos emissores secundários de luz	55
Figura 7	Produção de ROS no sangue total de pacientes sépticos	58
Figura 8	Visualização da adesão de neutrófilos por microscopia óptica de contraste de fase	59
Figura 9	Detecção da atividade da MPOi em pacientes sépticos	61
Figura 10	Detecção da atividade da MPOi em paciente sépticos acompanhada por 2 e 3 dias consecutivos	62

Figura 11	Eritrócitos visualizados por microscopia óptica	64
Figura 12	Eritrócitos visualizados por microscopia eletrônica de varredura	66
Figura 13	Produção de ROS pelos macrófagos J774 em presença de eritrócitos	68
Figura 14	Microscopia eletrônica de varredura da fagocitose dos eritrócitos pelos macrófagos J774	70
Figura 15	Expressão da fosfatidilserina em paciente séptico e voluntário sadio	71
Figura 16	Produção de ROS pelos neutrófilos em presença de eritrócitos	73
Figura 17	Microscopia eletrônica de varredura da fagocitose dos eritrócitos pelos neutrófilos	75
Tabela 1	Dados clínicos de pacientes sépticos	53
Tabela 2	Dados clínicos de voluntários sadios	54

LISTA DE ABREVIATURAS

e-NOS	Óxido nítrico sintase endotelial
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GSH	Glutathiona
GSNO	S-nitrosoglutathiona
GSSG	Glutathiona oxidada
HOCl	Ácido hipocloroso
i-NOS	Óxido nítrico sintase induzida
LPS	Lipopolissacarídeo
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MODS	Síndrome da disfunção orgânica múltipla
MPO	Mieloperoxidase
MPOi	Mieloperoxidase insolúvel

NFκB	Fator nuclear κB
NO	Óxido nítrico
ONOO ⁻	Peróxido de nitrito
PAF	Fator de ativação de plaquetas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PMNs	Polimorfonucleares
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SOD	Superóxido dismutase
VCAM-1	Molécula de adesão a célula vascular-1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Aspectos gerais da sepse.....	13
1.2. Neutrófilos.....	15
1.3. Mieloperoxidase.....	17
1.4. Óxido nítrico (NO).....	19
1.5. Glutathiona.....	24
1.6. Eritrócitos.....	27
1.7. Disfunção microcirculatória.....	33
1.8. Disfunção endotelial.....	35
2. HIPÓTESE.....	38
3. OBJETIVOS.....	38
3.1. Objetivo Geral.....	38
3.2. Objetivos Específicos.....	38
4. JUSTIFICATIVA.....	39
5. CASUÍSTICA.....	39
5.1. Pacientes.....	39
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
6.1. medida da produção de ros no sangue total.....	40
6.2. microscopia óptica de contraste de fase.....	41
6.3. Detecção da atividade da mPO insolúvel.....	42
6.4. Dosagem de proteína.....	43
6.5. Obtenção de eritrócitos.....	43
6.6. Cultura de macrófagos de linhagem- J774.....	45

6.7. Medida de ROS produzido pelos macrófagos J774 em presença de eritrócitos.....	46
6.8. Obtenção de neutrófilos polimorfonucleares.....	47
6.9. Medida de ROS produzido pelos neutrófilos em presença de eritrócitos.....	48
6.10. Microscopia eletrônica de varredura.....	49
6.11. Ligação de eritrócitos modificados à anexina v.....	50
6.12. Análise estatística.....	50
7. RESULTADOS.....	51
7.1. Produção de ROS no sangue total de pacientes.....	54
7.2. Microscopia óptica de contraste de fase.....	58
7.3. Atividade da MPOi derivada de neutrófilos ativado.....	59
7.4. Microscopia óptica.....	62
7.5. Microscopia eletrônica de varredura.....	64
7.6. Produção de ROS pelos macrófagos J774 em presença de eritrócitos.....	65
7.7. Microscopia eletrônica de varredura do processo de fagocitose pelos macrófagos J774.....	67
7.8. exposição da fosfatidilserina na superfície dos eritrócitos modificados oxidativamente.....	70
7.9. Produção de ros pelos neutrófilos em presença de eritrócitos.....	71
7.10. Microscopia eletrônica de varredura do processo de fagocitose pelos neutrófilos.....	73
8. DISCUSSÃO.....	74
9. CONCLUSÕES.....	81
10. ANEXO.....	83
11. REFERÊNCIAS.....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS DA SEPSE

A sepse é amplamente reconhecida como uma síndrome clínica complexa que resulta de uma resposta inflamatória sistêmica desordenada do hospedeiro evoluindo para uma infecção circulatória (Bone, Balk et al. 1992).

A sepse é a causa mais comum de óbito nas Unidades de Terapia Intensiva, com taxas de mortalidade entre 20 e 30%, e responsável por aproximadamente 220 mil óbitos por ano no Brasil (WHO, 2009). Dessa forma, é fundamental a descoberta de mecanismos iniciais que participem das complicações dessa patologia e que sejam alvos de terapia.

A disfunção microvascular é uma complicação importante da sepse, onde a ativação e disfunção endotelial desempenham papel essencial (Aird 2003).

As células fagocíticas do sistema imune inato, principalmente neutrófilo, controlam a resposta inflamatória causada pela invasão de patógenos pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e fagocitose (Morel, Doussiere et al. 1991). Quando esses mecanismos de controle falham, ocorre a inflamação sistêmica, agravando a infecção para sepse, sepse grave ou choque séptico (Annane, Bellissant et al. 2005).

De acordo com a evolução do processo inflamatório, quando a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), uma resposta clínica inespecífica do hospedeiro, é decorrente do processo infeccioso, pode se instalar um quadro de sepse que pode evoluir para sepse grave comumente acompanhado por disfunções orgânicas. Esse quadro pode culminar em choque séptico, a mais grave complicação da sepse, caracterizado por hipotensão refratária à reposição volêmica,

ou seja, a ação dos vasopressores. O final do processo é caracterizado pela síndrome da disfunção orgânica múltipla (MODS), que é definida pela presença de funções orgânicas alteradas em pacientes agudamente doentes, de modo que a homeostase não pode ser mantida sem intervenção (Bone, Balk et al. 1992).

Durante infecções causadas pela invasão do microrganismo (bactérias ou fungos), os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) que são as primeiras células do sistema imune inato a serem ativadas (produtoras de ROS), visam erradicar a invasão do patógeno. A captura do microrganismo induz a morte celular dos PMNs induzida por fagocitose a qual é dependente da produção de ROS e é importante para resolução da infecção e inflamação (Watson, Redmond et al. 1996; DeLeo 2004; Wilkie, Vissers et al. 2007).

Em células fagocíticas, o radical superóxido é produzido pelo complexo enzimático NADPH oxidase (NOX) (Babior 1984), o qual é inativo nas células em repouso, mas se torna rapidamente ativado em resposta a uma variedade de estímulos quimiostáticos e fagocíticos, incluindo citocinas e produtos bacterianos, como por exemplo lipopolissacarídeo (LPS) e peptídeos como N-formilmetionilleucilfenilalanina (fMetLeuPhe). A expressão da NADPH oxidase é reconhecida como um componente crítico da imunidade inata, responsável pela geração de ROS microbicida, causando danos teciduais e promovendo doenças inflamatórias como Alzheimer, doença pulmonar obstrutiva crônica, diabetes e sepse (Bokoch and Zhao 2006), que são caracterizadas pelo aumento da produção de ROS bem como pela diminuição da atividade do sistema antioxidante, resultando em estresse oxidativo (Albano 2006).

A resposta do hospedeiro assim como a natureza do patógeno determina o desfecho em pacientes com sepse, como por exemplo, apesar da rápida

implementação de antibioticoterapia apropriada, a mortalidade de sepse permanece alta e, além disso, pacientes sépticos com culturas positivas e negativas possuem taxa de mortalidade comparáveis (Brun-Buisson, Doyon et al. 1995).

As manifestações clínicas mais importantes da sepse são causadas tanto pela invasão de patógenos quanto pela hipotensão e falência de órgãos que são resultados da desregulação de mediadores inflamatórios e produção excessiva de ROS derivada do hospedeiro (Crowther and Marshall 2001).

A inflamação sistêmica presente na sepse invariavelmente leva a ativação do sistema de coagulação, inibição de mecanismos anticoagulantes e fibrinólise. Já está claro que componentes do sistema de coagulação são capazes de agravar a resposta inflamatória (Opal and Esmon 2003).

Nos últimos anos, a investigação no campo da sepse tem expandido seu foco abrangendo também as micropartículas originadas da ativação dos polimorfonucleares (PMNs), endotélio e plaquetas que parecem afetar a função vascular por mecanismos dependentes do estresse oxidativo, além de contribuir para iniciação e propagação da cascata de coagulação (Mallat, Benamer et al. 2000; Berckmans, Nieuwland et al. 2001).

1.2. NEUTRÓFILOS

Os polimorfonucleares neutrófilos são células fagocíticas que representam 70% dos leucócitos circulantes e constituem a primeira linha de defesa do sistema imune inato. São recrutados para o sítio de infecção onde rapidamente fagocitam micróbios invasores. Seguida da fagocitose, os PMNs destroem patógenos pela liberação de ROS derivada de NADPH oxidase e uma ampla gama de componentes

antimicrobianos potentes dentro do vacúolo, contendo o patógeno, incluindo os halogênios oxidados produzidos pela mieloperoxidase (MPO) (Babior, Kipnes et al. 1973). Essas células extremamente importantes no estresse oxidativo liberam enzimas proteolíticas que não apenas destroem microrganismos, como também desempenham papel na patogênese de doenças pelos danos causados aos tecidos normais (Klebanoff 1967).

Em neutrófilos, o transporte de elétrons pela NADPH oxidase de células fagocíticas despolariza a membrana do vacúolo fagocítico e o pH em ambos os lados da membrana é alterado. A geração de superóxido no vacúolo alcaliniza este compartimento devido ao efeito eletrogênico desse radical, o que torna o citosol acidificado. Essas mudanças induzem o fluxo de íons secundários que resulta em ativação da MPO dos grânulos descarregada dentro do vacúolo, restituição do excesso de íon e variações do pH (Segal 2008). A ação dos PMNs é regulada pela apoptose que desempenha papel essencial na homeostasia celular e resolução da inflamação (Babior 2000) e está associada ao aumento da produção de ROS. Os macrófagos são responsáveis pela eliminação dos PMNs apoptóticos (Zhang, Hirahashi et al. 2003; Kobayashi, Voyich et al. 2004).

Estudos apoiam o conceito de que PMNs periféricos humanos produzem óxido nítrico (NO) quando ativados por uma variedade de estímulos tais como, produtos bacterianos, leucotrienos e ésteres de forbol (Wright, Mulsch et al. 1989). Essa função dos PMNs é de considerável interesse na inflamação e defesa do hospedeiro (Moncada and Higgs 1991).

O óxido nítrico produzido pelos PMNs pela reação com o superóxido produz peróxido de nitrito (ONOO^-) o mais poderoso dos oxidantes produzidos por essas células (Beckman, Beckman et al. 1990).

A capacidade de liberar micropartículas derivadas da superfície celular tem sido descrita para um número cada vez maior de tipos celulares principalmente PMNs em várias doenças caracterizadas pela presença de inflamação sistêmica. Essas micropartículas são produtos de descarte dos neutrófilos numa tentativa de auto desativação, contendo nas suas superfícies MPO, além de moléculas de adesão que podem levar a diversas disfunções vasculares (Gasser and Schifferli 2005).

1.3. MIELOPEROXIDASE

A mieloperoxidase é fonte importante de estresse oxidativo em humanos (Daugherty, Dunn et al. 1994), sendo uma enzima presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos, representando 2 a 5% do seu peso seco (Schultz and Kaminker 1962) e que desempenha um papel fundamental na atividade microbicida pelos neutrófilos (Klebanoff 1970). Monócitos humanos também possuem grânulos contendo MPO, embora sejam em menor número que em neutrófilos (Nichols and Bainton 1973).

O processo de fagocitose está associado com a ativação de NADPH oxidase, um complexo enzimático que fica localizado na membrana fagossomal e converte oxigênio em radical ânion superóxido (Griffin, Griffin et al. 1975). Ocorre uma dismutação do superóxido produzido para produção de H_2O_2 . Concomitantemente, os neutrófilos ativados liberam MPO dentro do fagossoma durante a degranulação e extracelularmente onde catalisa a reação de H_2O_2 com concentrações fisiológicas de íons halogênios (Cl^- , Br^- , SCN^-) oxidando principalmente íons Cl^- para formação de ácido hipocloroso (HOCl) (Klebanoff, 1967) devido a sua alta concentração nos fluidos corporais (Babior 2000). Essas espécies são importantes agentes

bactericidas, mas o ácido hipocloroso (HOCl) e o ácido hipobromoso (HOBr) têm sido implicados em danos teciduais em uma variedade de doenças inflamatórias (Klebanoff 1968; Weiss, Test et al. 1986).

Além disso, a mieloperoxidase também catalisa a formação de uma ampla variedade de ROS envolvida no mecanismo de defesa do hospedeiro contra patógenos invasores, porém, vale ressaltar que é a única peroxidase com capacidade de oxidar o Cl^- , gerando o HOCl em pH fisiológico (Hansson, Olsson et al. 2006), conhecido como um forte agente microbicida detectado no fagossoma de neutrófilos (Jiang, Griffin et al. 1997; Chapman, Hampton et al. 2002) e amplamente considerado para ser a maior arma dessas células (Klebanoff 1970).

O ácido hipocloroso reage rapidamente com um grupo extenso de moléculas funcionais, em pH fisiológico, o grupamento tiol e aminas são seus principais alvos (Peskin and Winterbourn 2001), resultando na depleção de glutatona (GSH), inativação de algumas enzimas intracelulares (Pullar, Winterbourn et al. 1999) e na formação de *N*-cloraminas (Thomas, Grisham et al. 1986) que por sua vez mantêm a capacidade oxidante suficiente para oxidar cisteínas, metionina e centros metálicos (Shechter, Burstein et al. 1975). Uma vez que as *N*-cloraminas são menos reativas do que HOCl, elas são capazes de propagarem os danos nos locais de retirada da fonte de HOCl (Thomas, Grisham et al. 1986).

Os danos mediados por MPO não se limitam a microrganismos intrafagossomais, pois o HOCl e outros produtos gerados da atividade de MPO podem causar danos a macromoléculas biológicas e degradação tecidual. Assim, esta peroxidase tem sido associada à patogênese de diversas doenças inflamatórias (Nauseef 2001) e sua atividade é inibida pela adição de azida sódica (Klebanoff 1970).

1.4. ÓXIDO NÍTRICO (NO)

O óxido nítrico é uma molécula lipossolúvel e altamente reativa envolvida em inúmeros processos fisiológicos (Stamler, Singel et al. 1992). Fisiologicamente, o NO é o maior determinante do tônus vascular (Feelisch and Noack 1987; Palmer, Ferrige et al. 1987), influenciando diretamente a perfusão sanguínea e conseqüentemente a entrega de O₂ tecidual. Na circulação a meia-vida do NO é <0,1 segundo (Liu, Miller et al. 1998), porém, combina com uma ampla quantidade de moléculas biológicas (Stamler, Singel et al. 1992).

O óxido nítrico é produzido *in vivo* pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) a partir da L-arginina e na presença dos cofatores: NADPH e O₂. A isoforma endotelial (e-NOS) é uma enzima constitutiva, dependente de cálcio, que tem papel no controle fisiológico da pressão sanguínea (Moncada, Palmer et al. 1991). Uma vez sintetizado, o NO pode difundir para dentro das células do músculo liso, onde reage com o grupo heme da guanilato ciclase, gerando guanosina monofosfato cíclico (GMPc) que por sua vez é responsável pela vasodilatação induzida por NO pelo cálcio citoplasmático (Ignarro, Byrns et al. 1987).

Em muitas outras células, incluindo células endoteliais vasculares, células musculares lisas e fagócitos existe uma enzima indutível (iNOS) para produção de NO independente de cálcio e que normalmente não é expressa, mas é sintetizada *de novo* em resposta a inflamação (Hibbs, Taintor et al. 1988), levando a produção de grande quantidade de NO e vasodilatação acentuada (Petros, Bennett et al. 1991).

Parte do NO produzido pela e-NOS e liberado na corrente sanguínea é capturado pela hemoglobina presente em eritrócitos intactos, contribuindo para o

controle vascular em nível de perfusão de órgãos. Esse processo foi descrito em 1996, por Jia e colaboradores pelo mecanismo alostérico positivo em relação à absorção e liberação de O₂ e NO, envolvendo o grupamento heme e tiol. Eles propuseram que os eritrócitos com deoxihemoglobina capturam O₂ e NO no pulmão e assim em direção aos sítios de baixa pressão de O₂ liberam ambos. O óxido nítrico é capturado pelo resíduo de cisteína 93 da cadeia β da deoxihemoglobina e a liberação junto com O₂ é pela proteína de troca aniônica (AE1) (Pawloski, Hess et al. 2001). Alterações estruturais da molécula de hemoglobina nos eritrócitos como por exemplo, a hemoglobinação, leva a um defeito de transporte de NO (Pawloski, Hess et al. 2005).

Esses achados realçam novas descobertas para propriedades alostérica e eletrônica da hemoglobina que parecem estar envolvidas no controle da pressão sanguínea e que podem facilitar a entrega de O₂ nos tecidos (Jia, Bonaventura et al. 1996).

A reação de S-nitrosilação por tióis biológicos na presença de NO para formar S-nitrosotiol é considerada como mecanismo de ação importante de drogas nitrovasodilatadoras (Ignarro, Lipton et al. 1981). O óxido nítrico é altamente reativo e instável, sendo estabilizado pela reação com uma molécula carreadora, isto é, S-nitrosoglutationa (GSNO), sua forma ativa fisiológica que prolonga sua meia-vida entre 36 a 72h preservando sua atividade biológica (Radomski, Palmer et al. 1987).

O óxido nítrico desempenha papel importante pivô e multifacetado no complexo fisiopatológico da sepse. Na circulação, ele mantém a homeostasia microcirculatória pela regulação do fluxo sanguíneo, inibe agregação de plaquetas (Radomski, Rees et al. 1992) e está envolvido na inibição de adesão leucocitária no endotélio vascular e, além disso, também tem atividade antimicrobiana (Moncada,

Palmer et al. 1991; Bogdan 2001; Ignarro 2002). Durante a sepse, a microvasculatura não apresenta a vasodilatação necessária para a irrigação própria do órgão, causando assim injúria tecidual (Trzeciak, Cinel et al. 2008). Contudo, o NO por ser uma molécula reativa pode ser oxidada para o cátion nitrozônio (NO^+) (forma em que se encontra o S-nitrosotiol) e reduzida para o ânion nitroxil (NO^-) (Stamler, Singel et al. 1992).

Sendo o óxido nítrico um modulador crítico da resistência vascular produzido excessivamente durante a sepse (Wright, Rees et al. 1992), está claro que esse excesso de NO pela isoforma indutível da óxido nítrico sintase (iNOS) pode contribuir para a hipotensão refratária de vasopressores e danos nos tecidos inflamatórios associados com a formação de ROS. Os mediadores associados a sepse, tais como endotoxinas e citocinas pró-inflamatórias têm sido demonstrados como indutores da iNOS e, portanto, ao aumento da produção de NO (Kilbourn, Traber et al. 1997).

Em 1990, Beckman e colaboradores propuseram que o mecanismo para a toxicidade do NO é devido a produção de peróxido de nitrito (ONOO^-) - reação entre superóxido liberado intracelularmente durante a formação de metahemoglobina (Fe^{+++}) e NO advindo do transporte pela hemoglobina (Fe^{++}). Essa reação é extremamente veloz e seu produto é um forte oxidante. Evidências consistentes têm demonstrado que os principais efeitos deletérios associados ao NO são, de fato, mediados pelo ONOO^- (Smith, Kapoor et al. 1999).

Embora o ONOO^- seja estável em pH alcalino, o ácido peróxido nitroso mesmo em pH neutro, é um forte oxidante responsável pela nitração de tióis (GSH) e tirosina (Goldstein, Meyerstein et al. 1997). Concentrações micromolares de NO podem matar microorganismos diretamente como, por exemplo, pela inibição da

respiração (Shi, Sohaskey et al. 2005) e indiretamente reagindo com o radical superóxido gerando ONOO^- (Alvarez and Radi 2003).

Sob certas condições, o oxidante ONOO^- , juntamente com seus produtos de degradação podem contribuir para danos celulares incluindo peroxidação de lipídio na membrana, nitrosilação de cisteína, nitração de proteínas, oxidação de grupamento sulfidril e interações com diferentes metais de transição (Radi, Beckman et al. 1991). Esses danos levam a desestabilização da membrana plasmática dos eritrócitos com consequente exposição da fosfatidilserina na superfície dessas células e modificações morfológicas oxidativas dos eritrócitos (Lang, Lang et al. 2005).

Na circulação, o maior removedor (scavenger) de ONOO^- são os eritrócitos. O peróxido de nitrito atravessa a membrana eritrocitária por difusão passiva ou pelo canal de ânion da banda 3 (Denicola, Souza et al. 1998) e induz a oxidação da oxihemoglobina com a formação de metahemoglobina/nitrato como produtos finais e uma reação em cadeia de radicais livres que gera superóxido. Este reage potencialmente com NO transportado pela hemoglobina originando maiores quantidades de ONOO^- , que por sua vez oxida o grupamento sulfidril (GSH), favorecendo um estado pró-oxidativo dos eritrócitos. A metahemoglobina é reduzida de volta para hemoglobina pelas redutases dependente de NADH e NADPH (Minetti, Pietraforte et al. 2000; Romero, Radi et al. 2003).

A densidade celular elevada dos eritrócitos, concentração intracelular de hemoglobina e a razão constante de segunda ordem de oxihemoglobina/ ONOO^- leva para a hipótese de que os eritrócitos são os maiores alvos de ONOO^- gerado na vasculatura e a hemoglobina a removedora (scavenger) intracelular eficiente (Romero and Radi 2005; Romero, Denicola et al. 2006).

A formação de metahemoglobina induz a ativação metabólica, uma vez que a redução desta requer a ativação do metabolismo de glicose pela via glicolítica e via das pentoses em direção a regeneração de NADH e NADPH que são cofatores de diversas enzimas, incluindo a metahemoglobina redutase (Bulbarelli, Valentini et al. 1998). Este processo é extremamente agravado pelo aumento de produção de NO pela iNOS sintetizada *de novo* (figura 1).

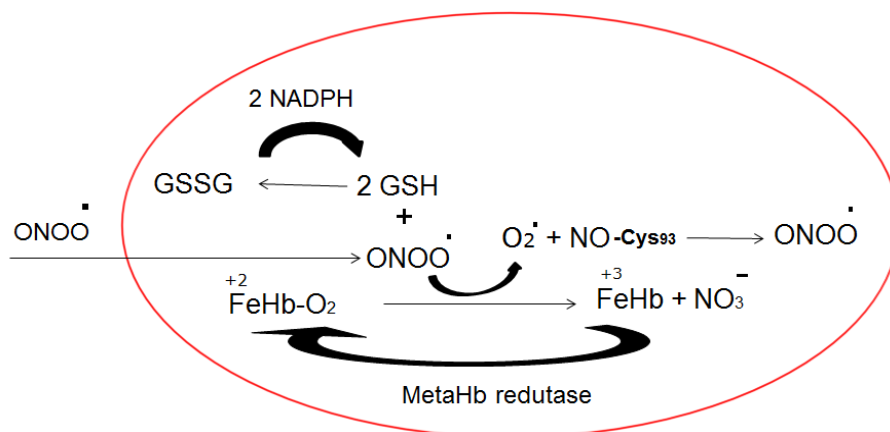


Figura 1: Interação do ONOO^\bullet com componentes do eritrócito.

1.5. GLUTATIONA

A glutationa (GSH) é um tripeptídeo sintetizado a partir de glutamato, cisteína e glicina através da γ -glutamilcisteína sintetase e GSH sintetase. É um antioxidante predominante em células animais e o mais abundante tiol não proteico de baixo peso molecular (Kaplowitz, Aw et al. 1985).

O grupo tiol da GSH é responsável por atividades biológicas e como removedor nucleofílico, a GSH pode ser oxidada não-enzimaticamente pelas substâncias eletrofílicas, tais como ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) ou ser oxidada pela GSH peroxidase para GSH oxidada (GSSG). Em células saudáveis, a glutationa oxidada (GSSG) é rapidamente reduzida de volta para glutationa (GSH) pela glutationa redutase e NADPH, assim a maior parte de GSH (>90%) permanece na forma reduzida (figura 2) (Meister and Anderson 1983).

A potência da glutationa como antioxidante é realçada pelo fato de ser catalisada por enzimas (especificidade e velocidade) e por ser um substrato renovável pela ação da glutationa redutase. Portanto, a GSH é essencial para manutenção do status redox intracelular e defesa contra danos oxidativos. Porém, sob estresse oxidativo, GSH é convertido para GSSG o qual potencialmente acumula no citosol e isso leva a ativação do desvio da glicose para o ciclo da pentose para fornecer NADPH como também o efluxo do GSSG para evitar tioração de proteínas (Griffith 1999; Lu 2000).

De fato, a razão GSH/GSSG é usada frequentemente para avaliar estresse oxidativo em sistemas biológicos (Chesney, Eaton et al. 1996). Contudo, o HOCl gerado pelo sistema mieloperoxidase- H_2O_2 - Cl^- dos neutrófilos e cloraminas podem converter GSH para produtos irreversíveis de oxidação e, além disso, foi relatado

que aproximadamente metade da GSH oxidada pelo HOCl não pode ser regenerado (Winterbourn 1985). Alterações na razão dessa dupla redox se associam com toxicidade celular, tal como ocorre em sepse, doenças cardiovasculares, infecção pelo HIV e distúrbios imunológicos (Herzenberg, De Rosa et al. 1997; Lang, Mills et al. 2000).

Os eritrócitos representam o maior reservatório antioxidante do sangue, principalmente através do sistema GSH, o qual promove a capacidade de redução para diversas reações: detoxificação do peróxido de hidrogênio (glutathione peroxidase) e do peróxido de lipídio (glutathione S-transferase); contribui para função normal de muitas proteínas pela manutenção de grupamento sulfidril na forma reduzida; regeneração de vitaminas antioxidantes (vitamina E) e detoxificação de uma variedade de xenobióticos (Kaplowitz, Aw et al. 1985; DeLeve and Kaplowitz 1990; Suthanthiran, Anderson et al. 1990).

Em condições patológicas, a baixa razão de GSH/GSSG pode ser devida, em parte, a diminuição da atividade da GSH redutase encontrada nos eritrócitos (Raththagala, Root et al. 2006). Em outras palavras, a diminuição de quantidades de GSH não deve estar associada à baixa produção desse tripeptídeo, mas sim a incapacidade dos eritrócitos de manter os níveis de GSH acima do ataque oxidante como acontece na deficiência de glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PD) (Mareni and Gaetani 1976).

O aumento dos níveis de ROS intracelular pode ser o resultado do aumento da produção de ROS, redução da degradação de ROS pelas defesas antioxidantes ou ambos. A capacidade da defesa antioxidante intracelular natural para limitar o aumento dos níveis de ROS induzido pela sepse é desconhecido. Em particular, o

efeito do plasma de pacientes sépticos na defesa antioxidante não está ainda descrito, porém tem sido sugerido que sepse pode diretamente alterar defesas antioxidantes (Goode, Cowley et al. 1995).

A glutatona desempenha papel importante em muitos processos celulares, incluindo diferenciação celular, proliferação e apoptose; além disso, concentrações baixas de GSH têm sido demonstradas por influenciar a externalização da fosfatidilserina, produção de ceramida, atividade da caspase, ativação de fator de transcrição, e como resultado, distúrbios na homeostasia de GSH são implicados na etiologia e/ou progressão de várias doenças inflamatórias humanas (Ballatori, Krance et al. 2009).

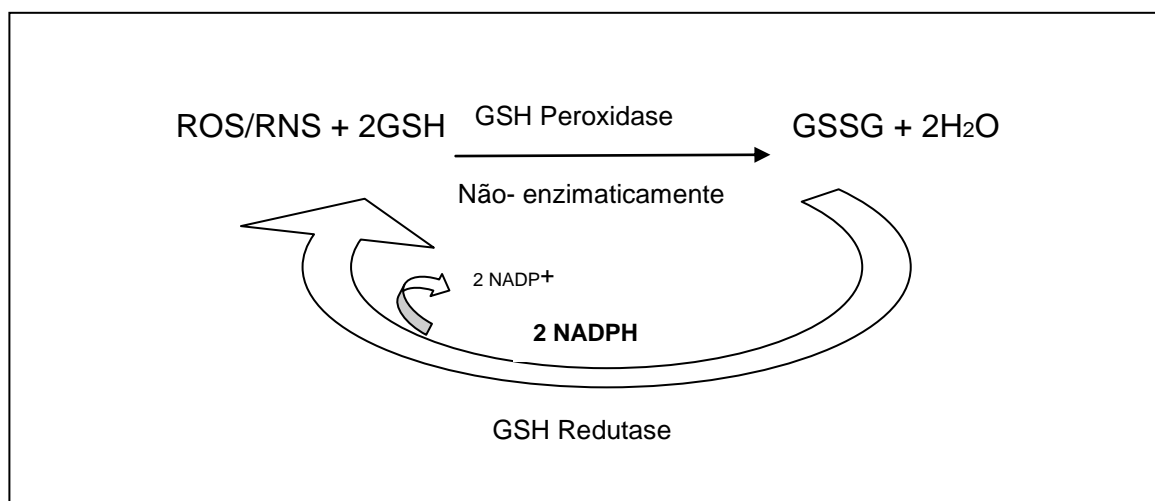


Figura 2: Oxidação e regeneração da GSH. ROS/RNS oxidam GSH não enzimaticamente ou através da GSH peroxidase produzindo GSSG, a qual rapidamente se renova para GSH pela GSH redutase na presença de NADPH advindo do ciclo da pentose e liberando durante a reação o NADP^+ .

1.6. ERITRÓCITOS

Em eritrócitos normais, choque osmótico, estresse oxidativo, depleção de energia e remoção de Cl^- provocam a liberação de prostaglandina E_2 (PGE_2) (Lang, Kempe et al. 2005 a), que por sua vez ativa canais de cátion permeáveis para Ca^{+2} (Kaestner and Bernhardt 2002; Lang, Kempe et al. 2005 b) com morte suicida de eritrócitos induzida pelo aumento da atividade de Ca^{+2} . Isto é, perda da assimetria de fosfatidilserina, retração e formação de “blebs” na membrana eritrocitária (Lang, Durantou et al. 2003) que caracterizam o processo de eriptose, termo que tem sido usado para descrever este tipo de morte eritrocitária (Lang, Lang et al. 2005).

O aumento da atividade de Ca^{+2} citosólico ativa os canais de Ca^{+2} sensíveis ao K^+ (Bookchin, Ortiz et al. 1987; Franco, Palascak et al. 1996) levando a hiperpolarização da membrana com subsequente perda de KCl o que favorece a retração do eritrócito (Lang, Warskulat et al. 2003). Nessas circunstâncias, a fosfolipase 2 ativada estimula o fator de ativação de plaquetas (PAF), principal mediador envolvido na regulação da inflamação, o qual é liberado (Dupuis, Levasseur et al. 1997) ativando a esfingomielinase para liberação de ceramida na superfície eritrocitária (Lang, Kempe et al. 2005 b) que também leva a retração e subsequentemente a eriptose (Lang, Myssina et al. 2003).

Além disso, a entrada de Ca^{+2} nos eritrócitos provoca um desarranjo de fosfolípido na membrana (Zhou, Zhao et al. 2002), levando assim a perda da assimetria da fosfatidilserina evidenciada pela ligação com anexina V provocada pelo choque osmótico e estresse oxidativo. (Gulbins, Jekle et al. 2000).

A fosfatidilserina exposta na superfície dos eritrócitos pode ser reconhecida pelos macrófagos, os quais possuem receptores específicos para fosfatidilserina

(Fadok, Bratton et al. 2000) e rapidamente engolfam e degradam os eritrócitos defeituosos do sangue periférico (Boas, Forman et al. 1998) ou por outro lado, podem aderir na parede vascular e assim impedir a microcirculação obstruindo capilares e em última instância, causando a insuficiência de órgãos. Portanto, evidências mostram que o aumento da permeabilidade de Ca^{+2} é o principal mecanismo que leva a morte suicida de eritrócitos (Closse, Dachary-Prigent et al. 1999).

Inúmeros estudos realizados em eritrócitos apoiam o conceito de que propriedades redox dos eritrócitos são indicativas do status oxidativo das diversas patologias do sangue (Minetti and Malorni 2006).

Em suma, os eritrócitos parecem ser a mais importante ferramenta de defesa antioxidante do sistema circulatório e os mais resistentes ao estresse oxidativo. Contudo, se danos oxidativos do microambiente superam a defesa dos eritrócitos, estes sofrem alterações oxidativas que ainda podem ser detectadas de forma estável no sangue periférico (Minetti, Leto et al. 2008).

Os eritrócitos não apenas podem gerar radicais livres durante sua duração de vida (120 dias), mas, além disso, estão em circulação com as células inflamatórias do sistema imune que quando ativadas, são também capazes de gerar radicais livres (Minetti and Malorni 2006).

Em condição parcialmente oxigenada, a hemoglobina pode sofrer auto-oxidação, produzindo o radical ânion superóxido. Reciprocamente, a hemoglobina deoxigenada pode reduzir o nitrito intracelular para NO através de sua atividade recentemente caracterizada de nitrito redutase (Rifkind, Nagababu et al. 2006). Dessa forma o NO liberado dos eritrócitos pode contribuir para o estresse nitrosativo

com a formação de ONOO^- , gerado pela reação de superóxido e radical óxido nítrico (Galli, Rossi et al. 2002).

O peróxido de nitrito foi reconhecido como fonte de espécies pró-oxidantes implicada em patologias celulares e envolvida em mecanismos patogênicos básicos nas principais doenças inflamatórias (Barnes 2000; Ichinose, Sugiura et al. 2000), por contribuir para oxidação da glutathiona (GSH), rearranjo do citoesqueleto, alterações morfológicas e ultraestruturais dos eritrócitos, ativação da caspase e externalização da fosfatidilserina (Matarrese, Straface et al. 2005).

Em virtude da sua potente capacidade oxidante, o ONOO^- tem sido proposto como um importante mediador inflamatório e considerado o principal componente do estresse nitrosativo.

A hemoglobina sendo altamente concentrada dentro dos eritrócitos está envolvida em uma série de reações de redox (Rifkind, Ramasamy et al. 2004). O heme ferroso de função normal da hemoglobina é continuamente auto-oxidado, produzindo metahemoglobina e o radical ânion superóxido (figura 3). Esta reação é a fonte de estresse oxidativo para os eritrócitos, pois o superóxido e níveis basais de metahemoglobina podem causar danos celulares.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado pelo decaimento do superóxido pela ação da superóxido dismutase (SOD) nos eritrócitos pode reagir com ambos Fe(II)Hb e Fe(III)Hb e produzir metahemoglobina e radical hidroxil (reação de Fenton) um potente oxidante capaz de iniciar diretamente reações de peroxidação de lipídios (figura 4) (Alayash, Patel et al. 2001; Reeder, Svistunenko et al. 2004).

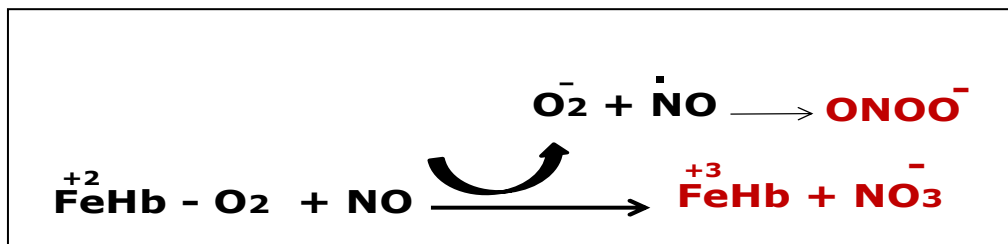


Figura 3: Autoxidação do heme ferroso eritrocitário formando metahemoglobina com a liberação do radical ânion superóxido.

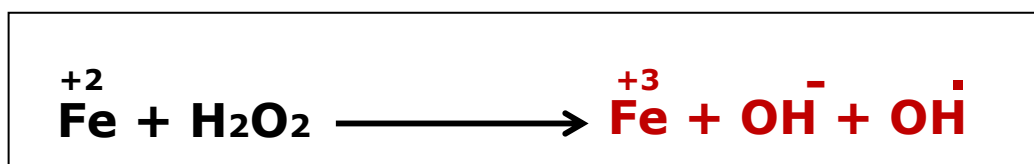


Figura 4: Reação de Fenton: ferro livre reagindo com peróxido de hidrogênio (obtido do decaimento do superóxido através da SOD), produzindo principalmente o radical hidroxil.

Os eritrócitos possuem função antioxidante e pró-oxidante. O primeiro é exercido em condições fisiológicas e o segundo pode ser detectado em diversas patologias inflamatórias humanas (esquematizado na figura 5). (Minetti and Malorni 2006).

Quando eritrócitos intactos circulam microambiente onde existe uma intensa produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, esses eritrócitos podem acumular danos oxidativos, com sérias consequências para suas propriedades funcionais e morfológicas, e mais importante, podem promover um comportamento

pró-oxidante que associado a esse microambiente contribuem para danos vasculares. (Matarrese, Straface et al. 2005; Pietraforte, Matarrese et al. 2007).

Por esta razão, biomarcadores celulares de eritrócitos modificados oxidativamente são potentes candidatos para monitorar não apenas patologias ligadas a eritrócitos, mas também outras condições patológicas associadas com estresse oxidativo (Minetti and Malorni 2006; Minetti, Agati et al. 2007).

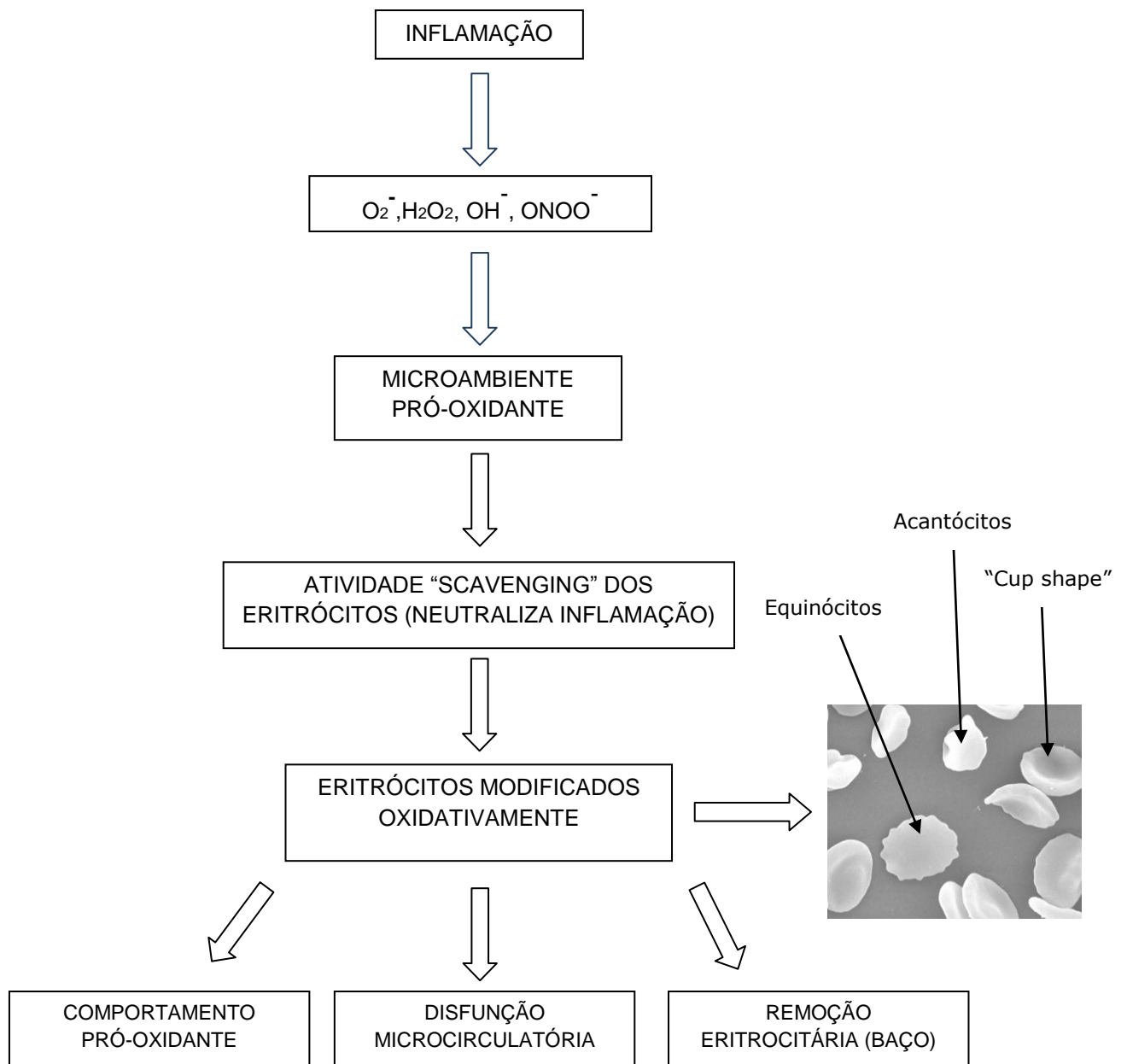


Figura 5: Função antioxidante e pró-oxidante dos eritrócitos (Minetti and Malorni 2006).

1.7. DISFUNÇÃO MICROCIRCULATÓRIA

A microcirculação é um sistema funcional integrado que satisfaz a demanda de oxigênio celular por toda parte do corpo. Quando esse sistema se torna deficiente, pode resultar em maldistribuição do fluxo sanguíneo e hipóxia tecidual. Existem dados que indicam o rompimento da microcirculação em sepse, assim, disfunção microcirculatória é um elemento crítico da patogênese de sepse grave ou choque séptico (Trzeciak, Cinel et al. 2008).

A função central da microcirculação é o endotélio, o qual é o responsável pela regulação de trombooses nos microvasos, profibrinolises, adesão de leucócitos, tônus microvascular, permeabilidade vascular e fluxo sanguíneo. Durante a sepse, a disfunção endotelial é envolvida no comprometimento da microcirculação e disfunção de órgãos (Trzeciak and Rivers 2005).

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio têm diversos efeitos potencialmente importantes na função endotelial e estão associadas a fisiopatologia da doença. O desequilíbrio entre a produção de ROS e sua remoção efetiva pelos sistemas antioxidantes pode induzir a disfunção endotelial e subsequentemente a insuficiência microcirculatória (Huet, Dupic et al. 2011).

O fluxo sanguíneo microcirculatório é bastante prejudicado na sepse e a disfunção microcirculatória desempenha um papel fundamental no desenvolvimento das manifestações de sepse grave e choque séptico (De Backer, Creteur et al. 2002).

Muitos dos mecanismos patogênicos de sepse ocorrem na microcirculação, que é composta de arteríola, capilar e vênula pós-capilar. A arteríola é onde as características hiporresponsivas de vasodilatação e vasopressor de sepse ocorrem.

O capilar é onde os efeitos de ativação/disfunção das células endoteliais são mais pronunciados e onde trombooses microvasculares são formadas. A vênula pós-capilar é onde o tráfico de leucócitos é mais desordenado, pois aderem na parede vascular, agregam e prejudicam ainda mais o fluxo sanguíneo na microcirculação. Portanto, os elementos básicos do perfil hemodinâmico, tais como hipotensão e hipovolemia, considerados distúrbios tipicamente macrovasculares, na verdade, estão enraizados na microcirculação (Trzeciak and Rivers 2005).

A disfunção e falência múltipla de órgãos ocorrem frequentemente em pacientes com sepse, mesmo após a restauração da aparente estabilidade hemodinâmica sistêmica. O funcionamento intacto e correto do sistema microcirculatório é essencial para a entrega eficiente do oxigênio tecidual, ainda, em sepse, mediadores da resposta inflamatória prejudicam a função microcirculatória (Trzeciak, Cinel et al. 2008).

Os mecanismos envolvidos incluem densidade capilar reduzida, disfunção endotelial com aumento da permeabilidade e apoptose, tônus vasomotor alterado, aumento do número de neutrófilos ativados com mais interações neutrófilo-endotélio devido ao aumento da expressão endotelial de moléculas de adesão de superfícies, como as selectinas, e ativação da cascata de coagulação com deposição de fibrina (Vincent and De Backer 2005).

Em resumo, sepse induz muitas mudanças no ambiente microvascular as quais são mediadas pela ativação e disfunção das células endoteliais. O resultado final desses efeitos é a diminuição do transporte de oxigênio, o qual, se não corrigido, pode levar a falência de órgãos e morte (Aird 2003).

Em pacientes sépticos, a insuficiência microcirculatória parece ser uma perturbação grave com prognóstico desfavorável, já que a sepse pode ser simplificada como uma desordem da microcirculação (Sakr, Dubois et al. 2004).

1.8. DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

O endotélio é um órgão altamente ativo que dinamicamente regula trombose nos microvasos, profibrinólise, adesão/migração de leucócitos, tônus microvascular, permeabilidade e fluxo sanguíneo em ambas as condições, fisiológicas e patológicas (Aird 2004).

Em infecções e subsequente sepse, produtos bacterianos tais como LPS, se ligam em receptores (NOD-like, toll-like 4) expressos na superfície das células endoteliais, neutrófilos, monócitos, resultando na produção de ROS e liberação de citocinas inflamatórias (Henneke and Golenbock 2002).

A produção de superóxido de neutrófilos ativados (Ohmori, Harada et al. 2000) e monócitos (Hiramatsu and Arimori 1988) juntamente com a liberação de proteínas catiônicas neutrofílicas e proteases, são fatores chaves na produção de danos endoteliais (Kim, Johnson et al. 2005).

Uma vez que a resposta inflamatória tenha sido instigada, inúmeros mediadores derivados do hospedeiro, incluindo citocinas, quimiocinas e produtos do sistema complemento, são também capazes de ativar as células endoteliais (Deem and Cook-Mills 2004).

O endotélio responde a ação desses mediadores com mudanças estruturais, tais como inchaço citoplasmático, descolamento e de forma importante com

mudanças funcionais como expressão de moléculas de adesão, resultando no aumento de adesão de plaquetas e leucócitos (Cook-Mills, Marchese et al. 2010).

Uma importante característica da disfunção endotelial em sepse é o aumento da permeabilidade vascular, resultando em redistribuição do fluido corporal e edema (Aird 2003).

Durante a inflamação os leucócitos são recrutados para dentro dos tecidos pelas moléculas de adesão endoteliais e quimiocinas (Lalor, Shields et al. 2002). Células endoteliais se ligam aos leucócitos por moléculas de adesão de superfície celular, como as selectinas e a molécula de adesão a célula vascular-1 (VCAM-1) (Chan and Aruffo 1993; Springer 1994; Springer 1995).

As citocinas, os sinais de estresse de cisalhamento turbulento, estímulo microbiano de receptores endoteliais (NOD-like, toll-like) por níveis elevados de ROS induzem a ativação da VCAM-1 (Iademarco, McQuillan et al. 1992) regulada pelo fator de transcrição NFκB nas células endoteliais (Marui, Offermann et al. 1993) que está envolvido na modulação da expressão de muitas respostas inflamatórias associadas com sepse grave (Nduka and Parrillo 2009).

A ligação entre leucócitos e a VCAM-1 estimula o fluxo de cálcio o qual ativa em seguida a forma NOX2 do complexo NADPH oxidase na membrana das células endoteliais para a produção de ROS (Cook-Mills, Johnson et al. 2004). Portanto, nas células endoteliais, a VCAM-1 ativa sinais intracelulares através de ROS.

A produção de ROS pelas células endoteliais estimuladas pela VCAM-1 ativa as metaloproteinases da matriz (MMPs) que são mantidas na superfície da membrana celular e moléculas de adesão (Rajagopalan, Meng et al. 1996).

As metaloproteinases da matriz associadas às células endoteliais que são ativadas durante a sinalização de VCAM-1 degradam a matriz extracelular e podem decompor moléculas de junção nas células endoteliais (Seiki 2002).

Essa degradação pelas MMPs e mudanças na estrutura da actina nas células endoteliais resulta na abertura de passagens estreitas vasculares como pequenas lacunas intercelulares através das quais os leucócitos podem migrar (Deem and Cook-Mills 2004).

A molécula de adesão a célula vascular-1 funciona no endotélio como ambos, um suporte para migração de leucócitos e como alvo da sinalização endotelial através da geração de ROS pelo NADPH-oxidase. Portanto, as ROS estão envolvidas na função das células endoteliais para promover a migração de leucócitos dependente de VCAM-1 (Cook-Mills, Marchese et al. 2010).

Quando existe a inibição dos sinais das moléculas de adesão das células endoteliais, leucócitos se ligam ao endotélio, mas não completam a migração transendotelial (Abdala-Valencia, Earwood et al. 2007).

As células que se ligam no endotélio, mas não completam a migração transendotelial são frequentemente liberadas do endotélio e continuam no fluxo sanguíneo. Assim, as moléculas de adesão das células endoteliais e seus sinais intracelulares são fonte para intervenção no recrutamento de leucócitos (Cook-Mills, Johnson et al. 2004).

O endotélio é considerado imunorregulatório já que inibindo a função das moléculas de adesão vascular, bloqueia o recrutamento de leucócitos e assim a inflamação nos tecidos. A função das células endoteliais durante o recrutamento dos leucócitos é regulado por ROS e antioxidantes (Cook-Mills, Marchese et al. 2010).

2. HIPÓTESE

Eritrócitos modificados oxidativamente ativam as células inflamatórias por um mecanismo de feedback positivo mesmo com bactérias indetectáveis no sangue.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o papel de ROS produzido durante a resposta inflamatória na sepse.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Caracterizar e medir quantitativamente ROS no sangue total de pacientes sépticos;

II. Detectar a presença da mieloperoxidase insolúvel (MPOi) de micropartículas de pacientes sépticos como marcador de ativação de neutrófilos;

III. Investigar a exacerbação da produção de ROS no processo inflamatório por eritrócitos modificados oxidativamente, estabelecendo um modelo *in vitro* desse processo;

IV. Quantificar ROS produzido pelos macrófagos J774 em presença de eritrócitos de pacientes sépticos;

V. Quantificar ROS produzido pelos PMNs em presença de eritrócitos de pacientes sépticos.

4. JUSTIFICATIVA

Com o fim de entender o papel de ROS na sepse, esses compostos foram medidos em tempo real em sistemas geradores. Esses dados, devido à complexidade de mensuração, estavam faltando na literatura, não permitindo a compreensão real da resposta inflamatória no desfecho dessa patologia.

5. CASUÍSTICA

5.1. PACIENTES

O sangue heparinizado de 12 voluntários sadios e 18 pacientes diagnosticados com sepse/choque séptico em antibioticoterapia foi coletado nas Unidades de Terapia Intensiva do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) em Salvador-BA. As amostras de sangue foram doadas após assinatura do “Termo de consentimento livre e esclarecido” (TCLE) pelos voluntários e responsáveis legais dos pacientes. Este protocolo foi autorizado pelo Comitê de Ética do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (HUPES).

Critérios de inclusão

1. Pacientes diagnosticados com sepse/choque séptico;
2. Pacientes de ambos os sexos;

3. Assinatura do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, permitindo a participação no estudo.

Critérios de exclusão

1. Pacientes terminais de câncer;
2. Pacientes com sorologia positiva para o vírus da imunodeficiência humana (HIV);
3. Pacientes com outros tipos de choque, como hipovolêmico e anafilático.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. MEDIDA DA PRODUÇÃO DE ROS NO SANGUE TOTAL

Foi usado 1 mL de sangue periférico heparinizado doado por pacientes sépticos e voluntários sadios. Após a coleta, as amostras de sangue permaneceram a 37°C por um período de aproximadamente 2 horas até serem processadas. A produção de ROS no sangue total foi detectada por quimioluminescência na presença de L-012 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) um emissor secundário de luz, derivado do luminol. Foi comparada a sensibilidade de 10 μ M de L-012 com 40 μ M de luminol (Sigma Chemical Co., St Louis, EUA) nas mesmas condições durante 4 amostras dos pacientes sépticos. A quimioluminescência foi mensurada através de um luminômetro (contador de fótons) projetado que possui um tubo fotomultiplicador (que incorpora uma superfície de gálio), resfriado a -20°C e possui uma eficiência quântica acima de 10% (aproveitamento do sinal luminoso incidente), alta sensibilidade e detecta luz de comprimentos de onda variando entre

200 e 900 nm. O sinal emitido pelo tubo fotomultiplicador é detectado diretamente por uma unidade contadora que transforma uma variação de corrente elétrica em uma contagem digital. Os dados são então coletados como média de contagens/segundo correspondendo aos fótons/segundo emitidos na reação de luminescência (Noronha-Dutra, Epperlein et al. 1993).

As amostras de sangue total sem nenhuma separação prévia foram adicionadas a placas de Petri de 35X10 mm diluídas em solução salina balanceada de Hank, sem vermelho fenol (HBSS) numa proporção de 1:1. Após leitura basal durante 200 segundos, 50 μ M de L-012 foi adicionado à placa e a leitura realizada depois de cada amostra atingir seu platô de fótons emitidos por L-012 ativado por ROS durante 100 segundos. Em seguida, foram adicionados separadamente inibidores de ROS para sua identificação: 250 μ M de hidralazina (Sigma), 1mM de desferroxamina (Sigma) para caracterização ONOO⁻ e 9,4 μ M de superóxido dismutase (SOD) (Sigma) para caracterização do superóxido seguido da adição de 40 μ M de azida sódica para caracterização da MPO.

A ativação do sangue total de voluntários sadios com 2,04 μ M de forbol miristato acetato (PMA), estimulador da proteína quinase C, foi considerado o controle positivo.

6.2. MICROSCOPIA ÓPTICA DE CONTRASTE DE FASE

Após medição de ROS no sangue total de pacientes sépticos e voluntários sadios descrita de acordo com o item acima, as placas de Petri foram lavadas com salina duas vezes e visualizadas por microscopia óptica de contraste de fase para observação dos neutrófilos ativados aderidos na placa de Petri.

6.3. DETECÇÃO DA ATIVIDADE DA MPO INSOLÚVEL

Foram coletados 10mL de sangue periférico com heparina, doado por pacientes sépticos e voluntários sadios. A separação entre plasma e eritrócitos foi feita pela centrifugação do sangue total a 290 g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o plasma rico em plaquetas (PRP) foi centrifugado a 4.500 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi submetido a três ultracentrifugações subsequentes a 100.000 g no rotor TLA-100.3 (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EUA) por 45 minutos a 4°C. Após as ultracentrifugações, o sobrenadante foi descartado e o sedimento com as micropartículas contendo MPO, ou seja, MPOi foi ressuspenso em HBSS. A mieloperoxidase se encontra aderida a micropartículas por atração eletrostática a uma determinada conformação de cargas (Santos, 2009). A detecção da atividade da MPOi nas micropartículas foi feita por quimioluminescência na presença do emissor secundário de luz, o L-012. As amostras (sedimento ressuspenso contendo MPO) com valores conhecidos de proteínas, previamente dosadas por fluorescamina, foram adicionadas a placas de Petri de 35X10 mm com 50µM de L-012 (diluído numa proporção 1:20 com tampão Tris-HCl 50mM pH= 7,5) e 1mL do meio HBSS cobertas com filme plástico e mantidas em uma câmara escura a 37°C durante todo o tempo da leitura. Após a leitura basal durante 200 segundos, 400µM de H₂O₂ (substrato para MPO) foi adicionado a placa e a leitura realizada depois de cada amostra atingir seu platô de fótons durante 100 segundos. Ainda durante a permanência do platô, foi adicionada 40µM de azida sódica (Sigma), um inibidor de peroxidases, dentre elas a MPO. Um outro inibidor usado foi o plasma humano (150µL), inibindo o ácido hipocloroso com a presença de proteína no meio (experimentos independentes).

6.4. DOSAGEM DE PROTEÍNA

Com o objetivo de se quantificar as proteínas das amostras de voluntários sadios e pacientes sépticos contendo MPO aderidas às micropartículas após 3 ultracentrifugações de 100.000 g a 45 minutos, como descrito no item acima, alíquotas dessas amostras foram diluídas em solução tampão de 0,1M de bicarbonato de sódio (Sigma) pH 8,0 e detergente NP 40 1%. Foram feitas diluições com concentrações finais de proteínas de 2µg/mL, 20µg/mL, 50µg/mL e 200µg/mL para se construir a curva de calibração. Distribuíram-se as amostras e 10µL de fluorescamina (Sigma) numa concentração final de 160µg/mL em placa de 96 poços. A leitura da fluorescência foi feita em fluorímetro SpectraMax M5 (Molecular Devices). A concentração de proteínas nas amostras foi determinada pela interpolação da fluorescência das alíquotas com as amostras de albumina do soro bovino (BSA) utilizada como padrão (concentração de 2mg/mL) (Miedel, Hulmes et al. 1989).

6.5. OBTENÇÃO DE ERITRÓCITOS

In vivo

Foram coletados 2mL de sangue heparinizado doado por pacientes sépticos e voluntários sadios. Durante a coleta, uma gota do sangue sem aditivo dos pacientes sépticos e voluntários, foi utilizada para preparação dos esfregaços (corado com Wright) e visualização dos eritrócitos por microscopia óptica. As amostras de sangue foram centrifugadas a 290 g por 10 minutos a 4°C para separação entre plasma e eritrócitos. O plasma e os leucócitos foram desprezados e os eritrócitos foram

lavados nas mesmas condições de centrifugação. A solução salina balanceada de Hank foi utilizada para ressuspender os eritrócitos nas lavagens. As amostras com 10^6 eritrócitos/mL foram deixadas por 30 minutos a 37°C, seguida da fixação com Karnovsky (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,4) por 16 horas a 4°C para serem observadas por microscopia eletrônica de varredura.

In vitro

Foram coletados 2mL de sangue heparinizado doado por voluntários sadios e centrifugados a 290 g por 10 minutos a 4°C para separação entre plasma e eritrócitos. O plasma e os leucócitos foram desprezados e os eritrócitos foram lavados duas vezes nas mesmas condições de centrifugação, utilizando a solução salina balanceada de Hank para ressuspender os eritrócitos.

Foram testados dois grupos para obtenção de eritrócitos modificados oxidativamente *in vitro*: 200µM de diamida (Sigma) e 200µM de diamida + 100µM de H₂O₂. No primeiro grupo, foram acrescentados 200µM da solução de diamida em $1,45 \times 10^6$ células/mL da suspensão de eritrócitos e no segundo H₂O₂ (100µM) + diamida (200µM) foram acrescentados sobre a mesma concentração de eritrócitos do primeiro grupo. Os eritrócitos não tratados foram considerados controle negativo. Uma alíquota foi retirada de cada amostra para preparação de esfregaço (corado com Wright) e visualização de eritrócitos modificados oxidativamente por microscopia óptica. As amostras foram deixadas por 30 minutos a 37°C e em seguida, fixadas com Karnovsky por 16 horas a 4°C para observação por microscopia eletrônica de varredura.

6.6. CULTURA DE MACRÓFAGOS DE LINHAGEM- J774

Descongelamento

As células guardadas a uma temperatura de -80°C , foram colocadas no gelo e adicionadas 1mL do meio de cultura RPMI completo suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% ciprofloxacina no próprio tubo de congelamento, homogeneizando-o. Transferiu-se todo o volume do tubo de congelamento para um tubo de 50mL contendo 10mL do meio de cultura RPMI completo, seguida da centrifugação a 290 g por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 1mL do meio de cultura RPMI completo. Todo o volume obtido no tubo de 50mL foi passado para uma garrafa de cultura pequena. As células foram visualizadas no microscópio invertido e colocadas na estufa a 37°C com 5% de CO_2 .

Plaqueamento

Após o cultivo, as células foram lavadas duas vezes com a solução salina 0,9% tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2, contendo 2mM de etilenodiaminotetracetato (EDTA) e deixada por 10 minutos a 4°C . As células aderidas foram soltas após movimentos mecânicos constantes na garrafa de cultura. Todo o volume da garrafa foi transferido para um tubo de 50mL e centrifugado a 515 g por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensão com 6 mL do meio de cultura RPMI completo.

Foram transferidos 300uL das células para cada lamínula estéril colocada na placa de 24 poços e guardada na estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 24 horas.

6.7. MEDIDA DE ROS PRODUZIDO PELOS MACRÓFAGOS J774 EM PRESENÇA DE ERITRÓCITOS

Foram coletados 2mL de sangue periférico com heparina, doado por voluntários sadios e pacientes sépticos. As amostras de sangue foram submetidas a uma centrifugação por 10 minutos a 290 g para separação entre o plasma e os eritrócitos. O plasma e os leucócitos foram desprezados e os eritrócitos foram lavados duas vezes nas mesmas condições de centrifugação, utilizando a solução salina balanceada de Hank para ressuspender os eritrócitos. As amostras com 10⁶ eritrócitos/mL de pacientes sépticos foram diluídas em HBSS numa proporção de 1:5 e deixadas a 37°C durante 1 hora. O controle positivo foi realizado com 10⁶ eritrócitos/mL de voluntários sadios, que, assim como os eritrócitos de pacientes sépticos, foram diluídos em HBSS numa proporção de 1:5 e tratados com 105µM de peróxido de nitrito (reação de ozônio, ~ 5% em oxigênio, com azida sódica 0,02-0,2M em água, pH12) (Pryor, Cueto et al. 1995) a cada 5 minutos por três vezes durante 1 hora em que a amostra permaneceu a 37°C e os eritrócitos não tratados foram considerados como controle negativo.

Cada lamínula com os macrófagos J774 aderidos, foi transferida para placa de Petri de 35X10 mm, acrescentada de 1mL do meio de cultura RPMI completo e deixada a 37°C por 1 hora. Uma alíquota da suspensão de eritrócitos (200µL) de cada amostra foi retirada para análise da produção de ROS durante a fagocitose que foi detectada por quimioluminescência na presença de 50µM de L-012. Para testar a

resposta celular para a produção de ROS, os macrófagos J774 foram estimulados com 2,04 μ M de PMA e medida a produção de ROS através da quimioluminescência dependente de L-012 (50 μ M). Após medida de ROS por quimioluminescência, os eritrócitos de cada grupo juntamente com os macrófagos J774 na placa foram deixados na estufa a 37°C durante 1 hora, seguida da fixação com Karnovsky por 16 horas a 4°C para observação por microscopia eletrônica de varredura.

6.8. OBTENÇÃO DE NEUTRÓFILOS POLIMORFONUCLEARES

Os neutrófilos polimorfonucleares foram obtidos a partir de 20mL de sangue heparinizado, doado por voluntários sadios. O sangue foi misturado com uma solução a 3% de dextran T-500, preparada em solução salina a 0,9% na proporção 2:1. Essa mistura foi deixada em repouso durante 30 minutos para sedimentação dos eritrócitos. O sobrenadante rico em leucócitos foi aspirado e centrifugado por 10 minutos a 750 g. O sedimento foi ressuspenso em 12 mL de PBS-EDTA e cada 6 mL foram adicionados cuidadosamente sobre 3 mL de Percoll e centrifugado a 800 g por 20 minutos a 20°C. Após descarte do anel de células mononucleares de sangue periférico formado e do sobrenadante, o sedimento rico em polimorfonucleares foi ressuspenso em 2 mL de PBS e os eritrócitos contaminantes foram lisados pela adição de 5 mL de água destilada e inversão lenta durante 1 minuto, seguidas da reconstituição isotônica do meio com 1,75 mL de uma solução de NaCl a 3,5%. Após a lise, a suspensão foi centrifugada a 150 g por 10 minutos a 4°C e as células lavadas duas vezes nas mesmas condições de centrifugação. PBS-EDTA foi utilizado para ressuspende as células obtidas para 10⁷/mL.

6.9. MEDIDA DE ROS PRODUZIDO PELOS NEUTRÓFILOS EM PRESENÇA DE ERITRÓCITOS

Foram obtidos 2mL de sangue com heparina, doado por voluntários sadios e pacientes sépticos. As amostras de sangue foram submetidas a uma centrifugação por 10 minutos a 290 g para separação entre o plasma e os eritrócitos. Os eritrócitos foram lavados duas vezes nas mesmas condições de centrifugação. A solução salina balanceada de Hank foi utilizada para ressuspender os eritrócitos durante as lavagens. As amostras com 10^6 eritrócitos/mL de pacientes sépticos foram diluídas 2,5 vezes em HBSS e deixadas a 37°C durante 1 hora. Os controles positivos foram tratados das seguintes formas:

- Eritrócitos de voluntários sadios tratados com ionóforo de cálcio (A23187) (Sigma): 10^6 eritrócitos/mL foram diluídos 2,5 vezes em HBSS e tratados com 20 μ M de ionóforo de cálcio, deixados a 37°C por 1 hora
- Eritrócitos de voluntários sadios tratados com 105 μ M de peróxido de nitrito: 10^6 eritrócitos/mL foram diluídos 2,5 vezes em HBSS e tratados com peróxido de nitrito, a cada 5 minutos por três vezes durante 1 hora em que a amostra permaneceu a 37°C.

Os eritrócitos não tratados foram considerados como controle negativo. Depois de permanecer 1 hora a 37°C, as amostras foram centrifugadas a 637 g por 1 minuto e o sedimento foi ressuspensão com o HBSS. Amostras com 10^7 neutrófilos/mL obtidas a partir do sangue total de voluntário sadio foram colocadas sobre eritrócitos tratados e não tratados numa proporção de 1:5 e deixados a 37°C por 10 minutos. Uma alíquota de 100 μ L da mistura de cada amostra foi diluída em

HBSS numa proporção de 1:10 na placa de Petri de 35X10 mm para detectar a produção de ROS pelos neutrófilos durante a fagocitose, através da quimioluminescência dependente do emissor secundário de luz, o L-012 (50µM). Amostras com 5×10^5 neutrófilos/mL foram estimuladas com 20µM de ionóforo de cálcio (A23187) e medida a produção de ROS através da quimioluminescência. A alíquota remanescente de cada amostra permaneceu a 37° durante 1 hora, seguida da fixação com Karnovsky por 16 horas a 4°C para observação por microscopia eletrônica de varredura.

6.10. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após a fixação com Karnovsky das amostras de macrófagos J774 e neutrófilos (separadamente) com os eritrócitos por 16 horas a 4°C como descrito no item acima, as amostras foram lavadas 3 vezes com cacodilato de sódio 0,1 M a 290 g por 5 minutos e então submetidas a pós-fixação em uma solução contendo tetróxido de ósmio a 1%, ferricianeto de potássio a 0,8% e cloreto de cálcio a 5mM por 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram lavadas por três vezes em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M para remover o excesso do pós-fixador. Após o descarte do sobrenadante, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 100% - três banhos) por 10 minutos em temperatura ambiente. As amostras não foram submetidas ao ponto crítico, porém secaram em temperatura ambiente e em seguida, foram metalizadas com ouro. Após metalização, o material está pronto para análise.

6.11. LIGAÇÃO DE ERITRÓCITOS MODIFICADOS À ANEXINA V

Para a detecção de fosfatidilserina (PS) na porção externa da membrana dos eritrócitos modificados oxidativamente, 1mL do sangue total periférico heparinizado de pacientes sépticos e voluntários sadios foram centrifugados a 290 g por 10 minutos. O plasma e os leucócitos foram desprezados e os eritrócitos foram lavados duas vezes nas mesmas condições de centrifugação. A solução salina balanceada de Hank foi utilizada para ressuspender os eritrócitos nas lavagens. As amostras com 10^6 eritrócitos/mL de voluntários sadios foram tratadas com $105\mu\text{M}$ de peróxido de nitrito e deixadas a 37°C durante 30 minutos. Em seguida, foram separadas duas alíquotas de cada amostra, sendo que uma alíquota foi lavada e diluída em $20\mu\text{L}$ de tampão de ligação com cálcio (10 mM HEPES/NaOH, contendo 140 mM NaCl e 2,5 mM CaCl_2 , pH 7,5; Sigma) e a outra não recebeu o tampão. Os eritrócitos foram incubados com $2\mu\text{L}$ de Anexina V- FITC (R e D Systems, Minneapolis, MN, EUA) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente (protegidas da luz), o volume das suspensões foi completado para $200\mu\text{L}$ e os eritrócitos analisados por citometria de fluxo.

6.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição dos dados foi testada como não gaussiana. As comparações entre dois grupos experimentais foram feitas pelo teste de Mann-Whitney. As análises entre mais de três grupos experimentais foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido por pós-teste de Dunn. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

7. RESULTADOS

As tabelas 1 e 2 mostram que 18 pacientes com sepse (10 mulheres, 8 homens) entre 7-75 anos ($52,7 \pm 17,6$) e 12 voluntários sadios (7 mulheres e 5 homens) entre 15 -74 anos ($50,25 \pm 17,5$) participaram do estudo. Em relação aos parâmetros hematológicos, observou-se uma leucocitose e neutrofilia significantes dos pacientes sépticos (24 ± 12 leucócitos/ μ l, $89.5 \pm 4\%$ neutrófilos) quando comparado com os voluntários sadios ($7 \pm 1,5$ leucócitos/ μ l, $61 \pm 6\%$ neutrófilos) ($P < 0,001$, teste de Mann-Whitney). Além disso, os pacientes apresentaram valores reduzidos de hemoglobina, hematócrito, eritrócitos e plaquetas em relação aos valores de referência (dados não mostrados).

TABELA 1 – Dados clínicos de pacientes sépticos incluídos no estudo.

Paciente	Sexo	Idade	Microrganismo	Leucócitos / μ L	Neutrófilos (%)	Desfecho
1	F	53	<i>Candida tropicalis</i>	23.820	93	O
2	F	67	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	26.740	91.1	O
3	F	36	BGNF* (não identificado)	16.926	85.3	S
4	M	47	<i>Escherichia coli</i>	17.500	89.9	O
5	M	59	<i>Staphylococcus aureus</i>	61.423	98.2	O
6	M	51	<i>Acinetobacter baumannii</i>	33.070 / 36.770	87.1 / 91.8	O
7	F	64	<i>Enterobacter cloacae</i>	21.850 / 24.880	89.2 / 94.5	O
8	F	55	<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	18.260 / 23.040 / 28.430	86.0 / 80.5/85.8	O
9	F	44	<i>Candida albicans</i>	46.870	95.0	O
10	F	39	<i>Staphylococcus sp.</i>	23.630	90.0	O
11	M	61	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	15.050	90.5	O
12	M	70	<i>Proteus mirabilis</i>	20.336	92.4	O
13	F	49	<i>Klebsiela pneumonia</i>	19.640	81.7	O
14	F	68	<i>Streptococcus sp.</i>	13.850	87.1	O
15	F	29	<i>Escherichia coli</i>	14.848	88.6	S
16	M	7	<i>Klebsiela pneumoniae</i>	15.750	84.0	S
17	M	73	<i>Candida glabrata</i>	16.210	86.5	S
18	M	78	<i>Staphylococos epidermidis</i>	14.848	88.6	O

M – masculino, F – feminino ; O – óbito, S- sobrevivência, *Bastonetes gram negativos não-fermentadores.

TABELA 2: Dados clínicos de voluntários sadios incluídos no estudo.

V oluntário	Sexo	Idade	Leucócitos /μL	Neutrófilos (%)
1	F	65	8.060	57.4
2	M	42	8.720	61.0
3	M	51	6.550	55.3
4	F	27	5.050	67.0
5	M	54	6.946	71.1
6	F	62	7.720	53.4
7	F	15	6.490	59.6
8	M	49	5.888	64.0
9	F	69	8.320	55.9
10	F	74	4.160	56.2
11	F	58	7.446	62.5
12	M	37	9.020	70.0

M – masculino , F – feminino

7.1. PRODUÇÃO DE ROS NO SANGUE TOTAL DE PACIENTES SÉPTICOS

A quimioluminescência aos produtos oxidativos foi testada na presença de dois emissores secundários de luz: luminol e L-012. O L-012 (10 μ M) demonstrou uma sensibilidade 40 vezes maior quando comparado com o luminol (40 μ M) em amostras de sangue total de pacientes sépticos nas mesmas condições, comprovada pela contagem de fótons/segundo. ($P < 0,02$, Teste de Mann Whitney) (Figura 6).

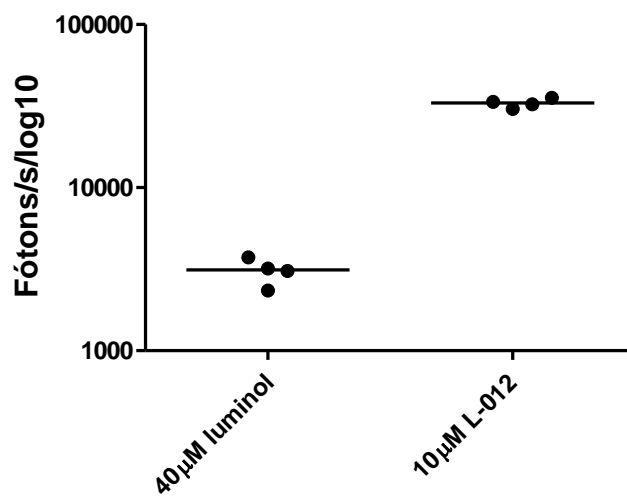


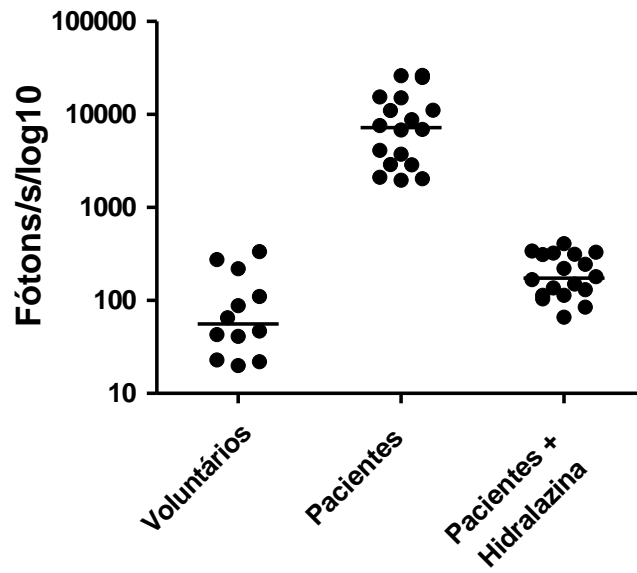
Figura 6: Comparação da sensibilidade dos emissores secundários de luz: luminol e L-012 em amostras de sangue total obtidos de pacientes sépticos. O L-012 (10 μ M) demonstrou uma sensibilidade 40 vezes maior quando comparado com o luminol (40 μ M) nas mesmas condições. Resultado está expresso como log10. $P < 0,02$ (Teste de Mann Whitney).

A figura 7a mostra que o sangue total de pacientes sépticos na fase aguda levou ao aumento acentuado na produção de ROS quando comparado com voluntários sadios e a quimioluminescência de L-012 resultante da produção de ROS foi reduzida significativamente pelo uso de hidralazina (250 μ M), um inibidor específico de ONOO⁻. ($P < 0,001$, Teste de Kruskal-Wallis seguido por pós-teste de Dunn comparando: voluntários sadios e pacientes sépticos; pacientes sépticos sem e com a presença do inibidor). Como demonstrado na figura 7b, a produção de ROS detectados de voluntário sadio corresponde a contagem basal de fótons, a qual se elevou quando o sangue total foi estimulado com 2,04 μ M de forbol miristato acetato (PMA) confirmando a viabilidade celular para produção de ROS (figura 7c).

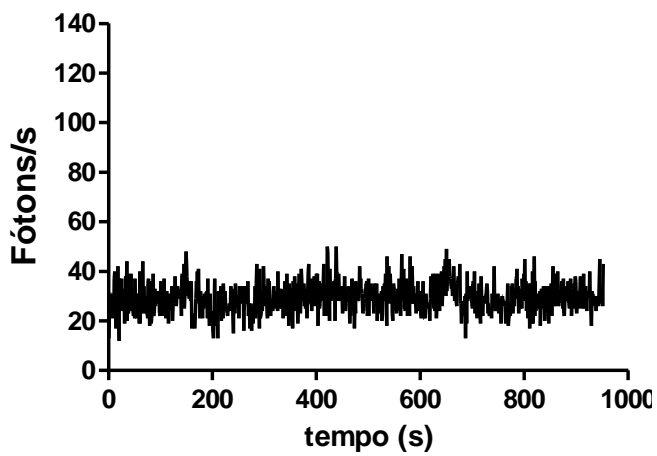
Foram usados separadamente, em amostras de um mesmo paciente, inibidores específicos de peróxido nitrito: hidralazina (250 μ M) e desferroxamina (1mM) e como podemos observar na figura 7d, além da maior produção de ROS em sangue total de pacientes sépticos quando comparada com sangue total de voluntários sadios, a adição dos inibidores de peróxido de nitrito à reação reduziu a produção de fótons detectados.

A figura 7e mostra que foram testados também outros inibidores de ROS para caracterizar a natureza do radical que estava sendo produzido no sangue total de pacientes sépticos. A adição de SOD (9,4 μ M) a placas após cada amostra atingir seu platô de ativação, resultou em redução moderada na emissão de fótons, sugerindo que houve consumo do ânion superóxido na reação. Em seguida, após realcançar um platô de fótons, a azida sódica (40 μ M) foi adicionada, levando a uma contagem basal de fótons/segundo, evidenciando a presença de peroxidases no meio.

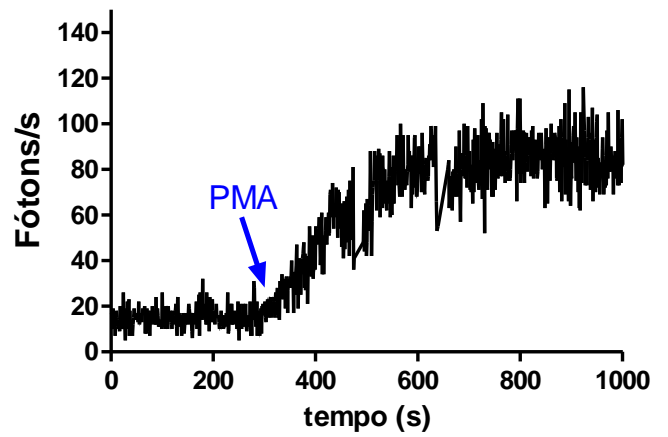
a)



b)



c)



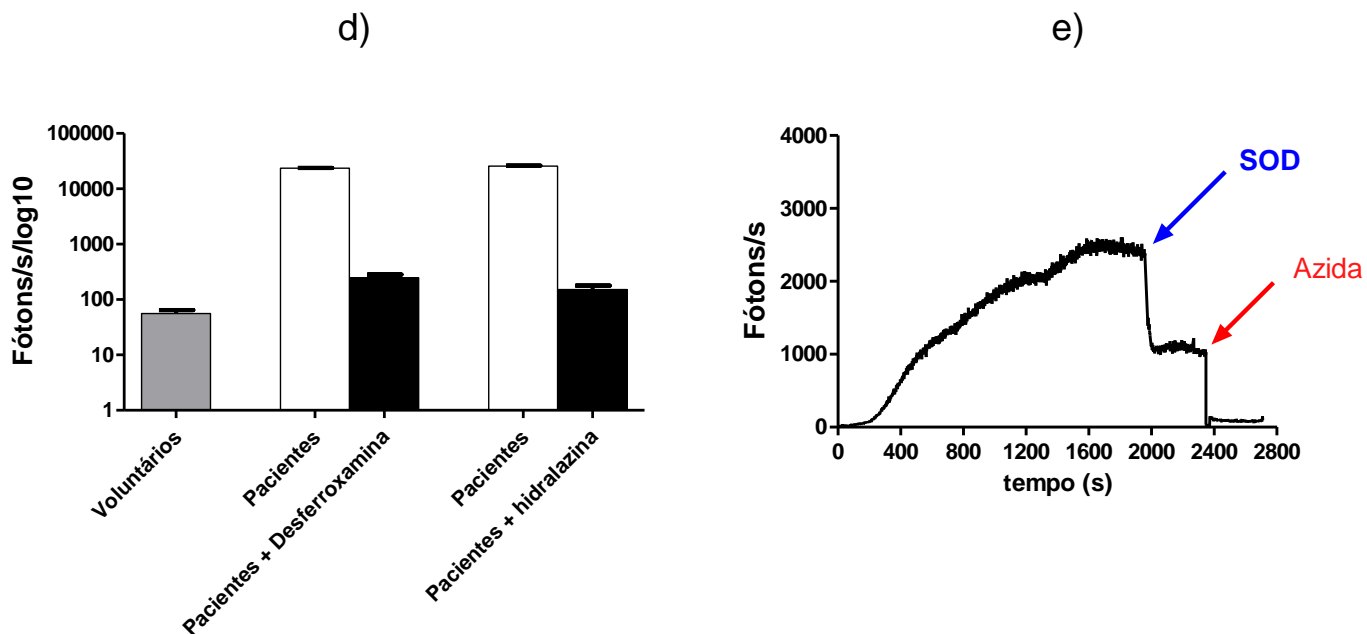
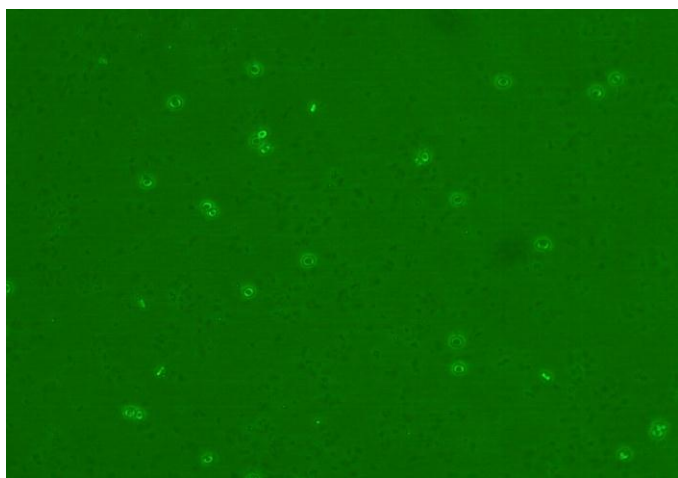


Figura 7: Produção de ROS no sangue total de pacientes sépticos através da quimioluminescência dependente de L-012. (a) Comparação da produção de ROS entre pacientes sépticos e voluntários saudáveis; pacientes com e sem a presença do inibidor (hidralazina). ($P < 0,001$, Teste de Kruskal-Wallis seguido por pós-teste de Dunn). (b) Contagem basal de fótons/segundo referente à produção de ROS no sangue total de voluntário saudável, (c) a qual foi revertida quando o sangue total foi estimulado com $2,04\mu\text{M}$ PMA. Resultado representativo de quatro experimentos realizados. (d) Efeitos dos inibidores específicos de ONOO^- ($250\mu\text{M}$ de hidralazina e 1mM de desferroxamina) na produção de ROS em sangue total de um mesmo paciente séptico. Resultado representativo de dois pacientes. (e) Caracterização das espécies reativas presentes no sangue total de pacientes sépticos através da adição de inibidores de ROS: $9,4\mu\text{M}$ de SOD seguido de $2,04\mu\text{M}$ de azida sódica. Resultado representativo de três pacientes.

7.2. MICROSCOPIA ÓPTICA DE CONTRASTE DE FASE

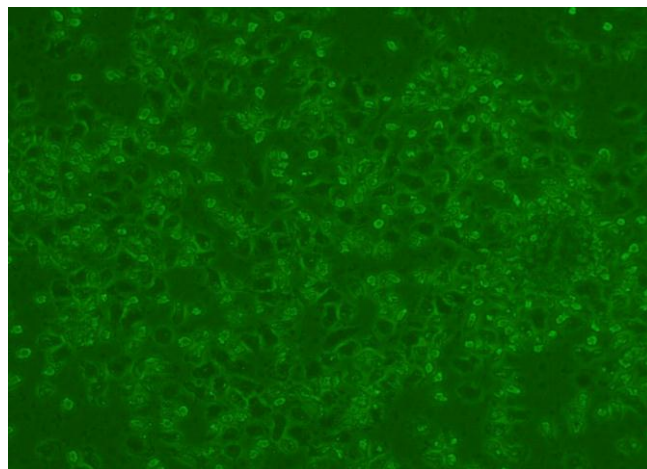
A adesão na placa de Petri dos neutrófilos ativados presentes no sangue total de pacientes sépticos foi visualizada por microscopia óptica de contraste de fase após a mensuração da produção de ROS no sangue total desses pacientes (figura 8a). Esses neutrófilos aderiram na placa de Petri associados com os eritrócitos. A adesão de neutrófilos ativados de voluntários sadios na placa de Petri foi reduzida quando comparada com pacientes sépticos (figura 8b).

a)



Voluntário sadio

b)



Paciente séptico

Figura 8: Visualização por microscopia óptica de contraste de fase da adesão na placa de Petri de neutrófilos ativados de (a) voluntário sadio e (b) paciente séptico, após medida da produção de ROS no sangue total. Experimento representativo de 4 pacientes.

7.3. ATIVIDADE DA MPOI DERIVADA DE NEUTRÓFILOS ATIVADOS

A atividade da MPO foi detectada por quimioluminescência em micropartículas derivadas de neutrófilos ativados de pacientes sépticos. A medida da atividade da MPOi expressa pela presença do seu produto, o ácido hipocloroso (HOCl), foi extremamente significativa quando comparada com a atividade da MPOi dos voluntários sadios.

A adição de azida sódica (40 μ M) à reação resultou na redução significativa dos fótons detectados, confirmando sua função inibidora de peroxidases, dentre elas a MPO (figura 9a) ($P < 0,0001$, Teste de Kruskal-Wallis seguido por pós-teste de Dunn comparando: voluntários sadios e pacientes sépticos; pacientes sépticos sem e com a presença do inibidor). Isso comprova que a quimioluminescência gerada a partir da oxidação do L-012 (50 μ M) foi dependente da atividade de MPO.

Na figura 9b, a atividade da MPOi de um paciente séptico aproximou-se de 10⁶ fótons/segundo o que corresponde a 7,5 vezes mais em relação aos pacientes da figura 9a e isso pode ser explicado pela acentuada neutrofilia presente na fase aguda (61.423 leucócitos/ μ L) nesse paciente. Esta atividade foi reduzida após adição da azida sódica à reação.

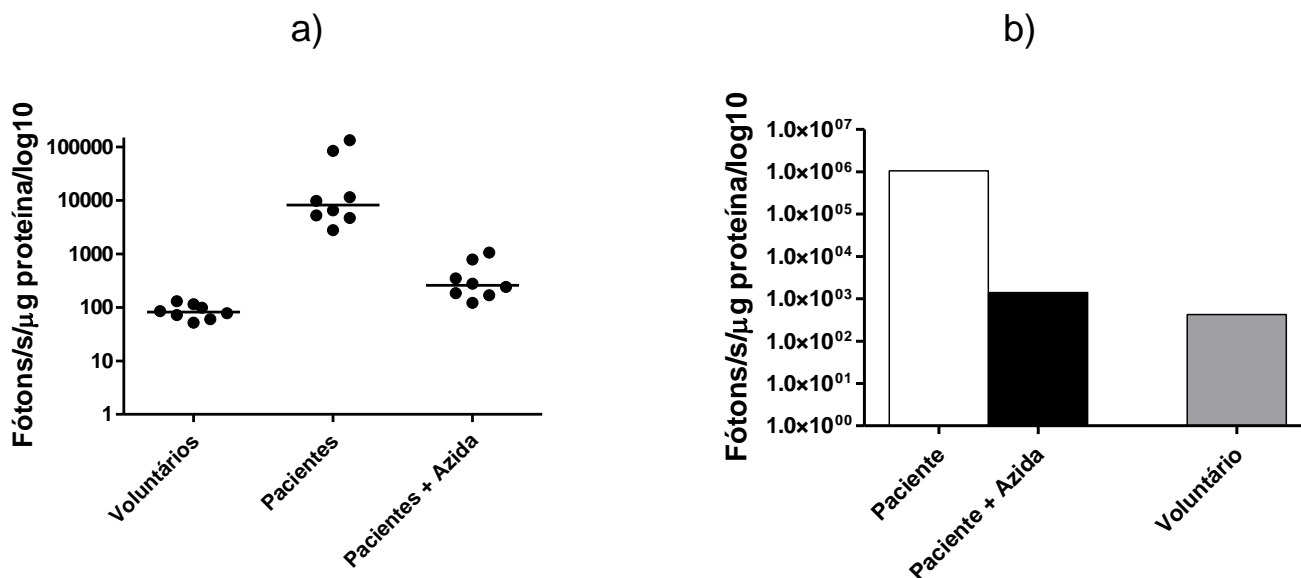


Figura 9: Detecção da atividade da MPOi derivada de neutrófilos ativados de pacientes sépticos por quimioluminescência. As micropartículas dos pacientes sépticos e voluntários sadios foram separadas do sobrenadante por três ultracentrifugações a 100.000g por 45 minutos. (a) Comparação da atividade da MPOi entre pacientes sépticos e voluntários; pacientes sem e com a presença do inibidor (azida). ($P < 0,0001$, Teste de Kruskal Wallis seguido por pós-teste de Dunn). (b) Atividade da MPOi de paciente séptico correspondendo 7,5 vezes mais em relação aos pacientes da figura 8a. Resultado está expresso como log10.

A atividade da MPOi também foi detectada em pacientes sépticos acompanhados por 2 (figura 10a) e 3 (figura 10b) dias consecutivos. A contagem de fótons/segundo de cada paciente aumentou com o passar dos dias e quando comparada com voluntário sadio. A quimioluminescência do L-012 resultado da presença de HOCl no meio, foi reduzida pelo uso do plasma humano (150μL) (figura 10a). Confirmando que o ácido hipocloroso (HOCl) ou ácido hipobromoso (HOBr) produzido pela reação de íons Cl⁻/Br⁻ com H₂O₂ catalisada por MPO, são capazes de reagir com aminas para produzir cloraminas (Winterbourn 1985) mais rapidamente

do que com L-012 resultando na diminuição da produção de fótons detectados na presença de proteína do plasma humano (Figura 9a). A adição da azida sódica (40 μ M), inibidor da MPO, à reação também resultou na redução da emissão de fótons/segundo (figura 10b).

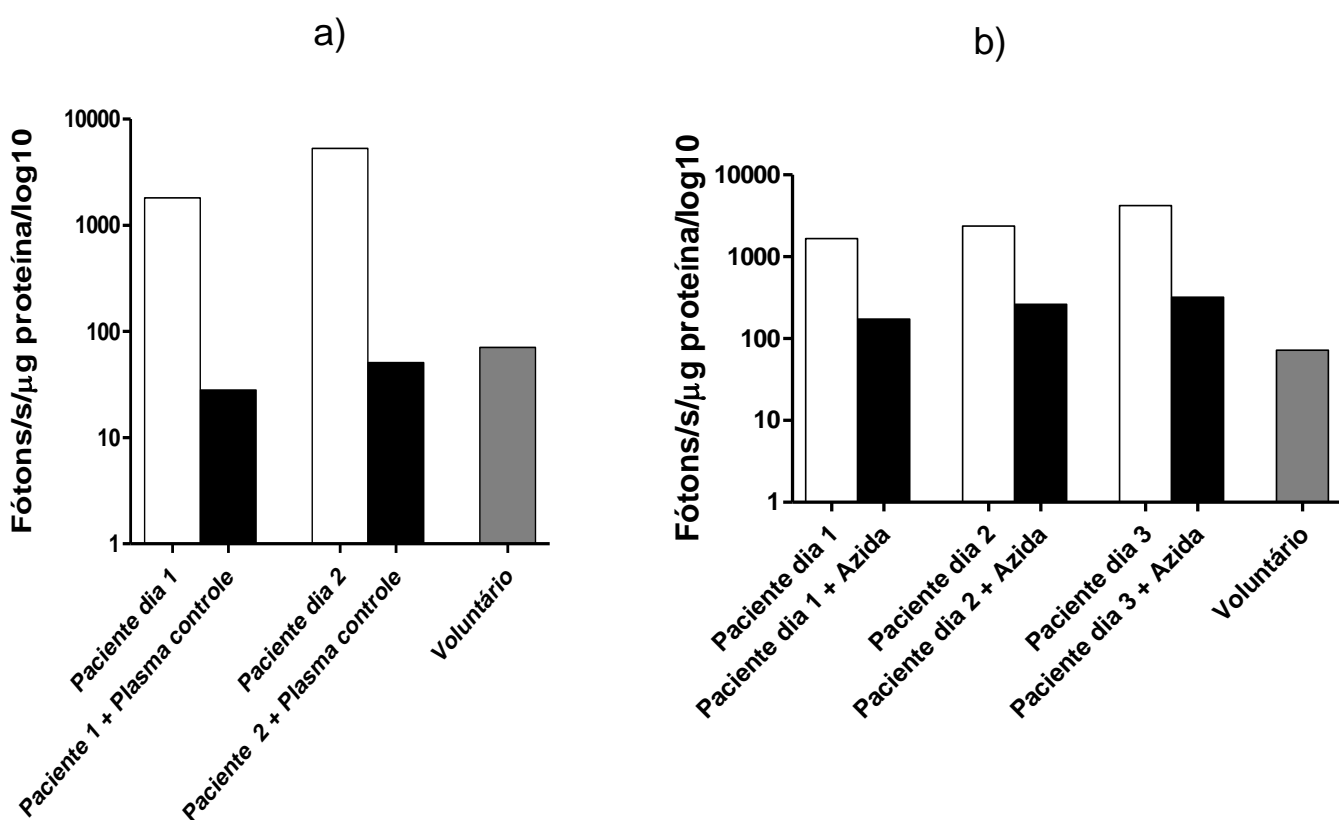
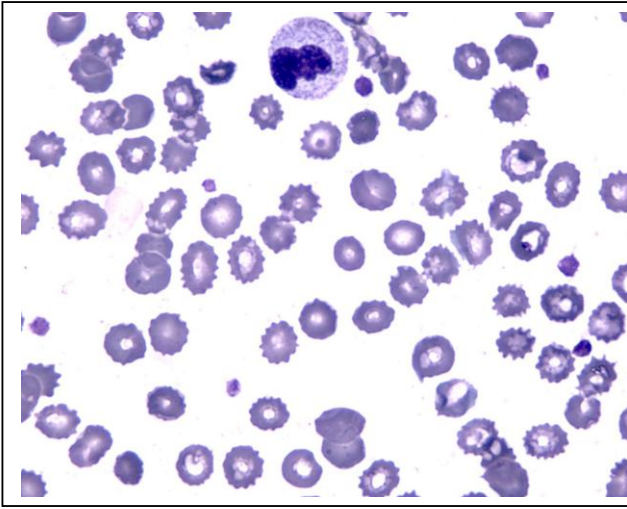


Figura 10: Detecção da atividade da MPOi derivada de neutrófilos ativados de paciente sépticos acompanhada por 2 dias (a) e 3 dias (b) consecutivos através da emissão de fótons/segundo por quimioluminescência. Resultado está expresso como log₁₀.

7.4. MICROSCOPIA ÓPTICA

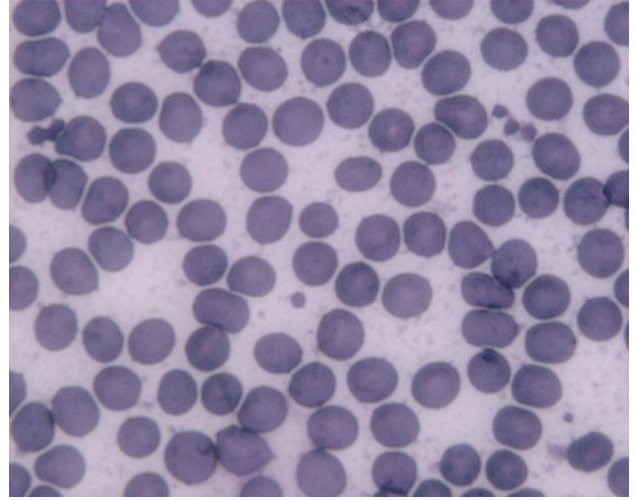
Os eritrócitos obtidos em esfregaços de sangue sem aditivo de pacientes sépticos e voluntários sadios foram observados por microscopia óptica. Nos esfregaços de pacientes sépticos, foi possível observar eritrócitos modificados oxidativamente com deformações morfológicas presentes no sangue periférico como equinócitos, acantócitos, “cup shape” e esferócitos (figura 11a). Esses eritrócitos modificados oxidativamente não foram visualizados no esfregaço de voluntários sadios (figura 11b). Ainda na figura 11a, é possível observar granulações tóxicas (grânulos azurófilos) contendo MPO em neutrófilos ativados de pacientes sépticos. Para mimetizar o processo de oxidação que ocorre nos pacientes sépticos, foi estabelecido um modelo *in vitro* desse processo e podemos observar nas figuras 11c e 11d eritrócitos modificados oxidativamente *in vitro* através do tratamento com diamida e diamida + H₂O₂ respectivamente, o que levou ao aparecimento de formas morfológicamente alteradas como as que foram encontradas no sangue de pacientes sépticos.

a)



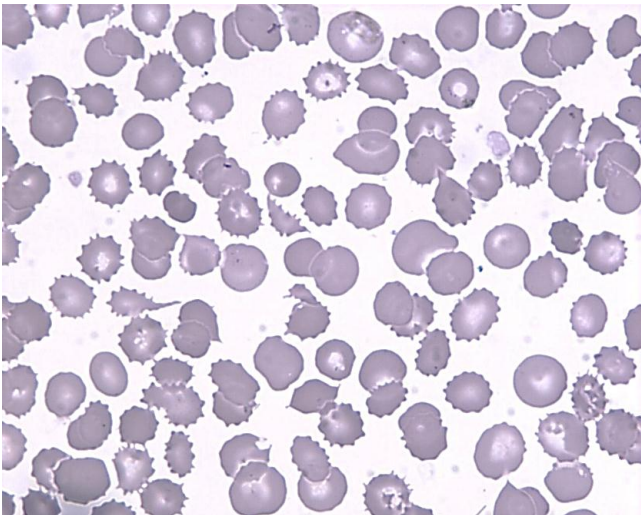
Eritrócitos de paciente séptico

b)



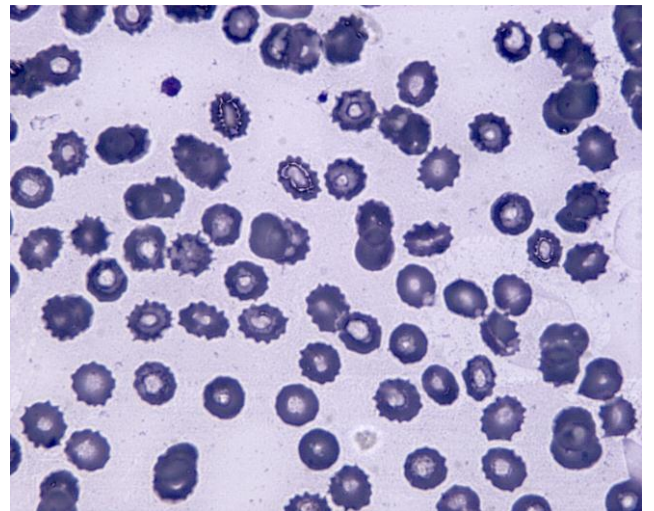
Eritrócitos de voluntário sadio

c)



Eritrócitos tratados com
diamida

d)



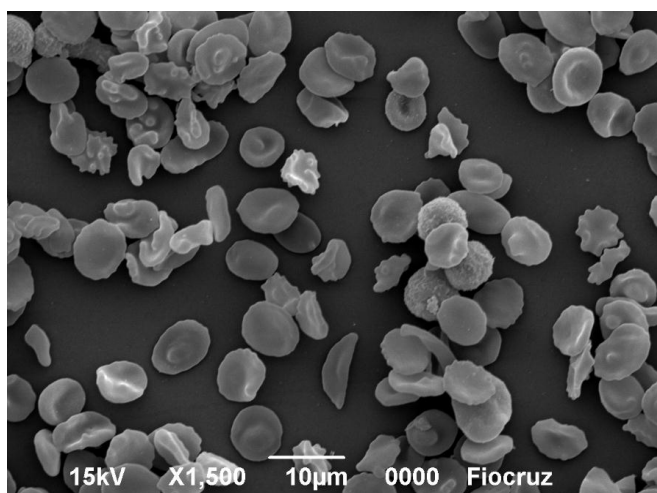
Eritrócitos tratados com
diamida + H₂O₂

Figura 11: Visualização por microscopia óptica de eritrócitos obtidos em esfregaços sanguíneos. (a) Eritrócitos intactos de voluntário sadio. (b) Eritrócitos modificados oxidativamente de pacientes sépticos adquirindo formas morfológicamente alteradas no sangue periférico com a predominância de equinócitos. (c) Eritrócitos modificados oxidativamente *in vitro* tratados com diamida e (d) diamida + H₂O₂, comparáveis com os eritrócitos obtidos de pacientes sépticos.

7.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

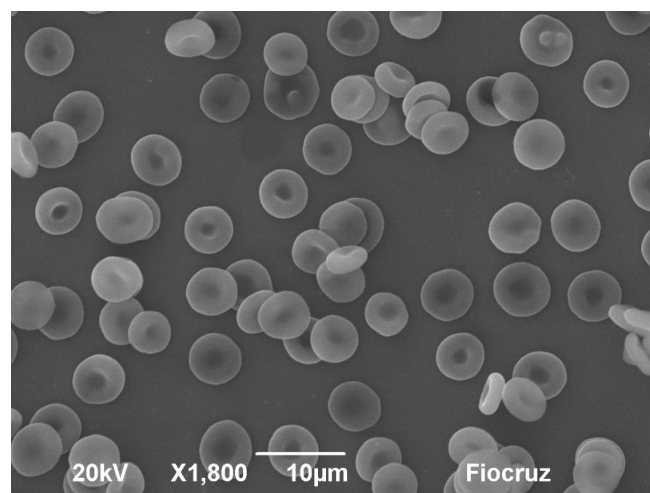
Os eritrócitos de pacientes sépticos e voluntários sadios foram visualizados por microscopia eletrônica de varredura, sendo que nos pacientes sépticos os eritrócitos estavam modificados oxidativamente com alterações morfológicas semelhantes as que foram visualizadas nos esfregaços de pacientes sépticos por microscopia óptica (figura 12a). Os eritrócitos de voluntários sadios preservaram sua forma bicôncava (figura 12b). As figuras 12c e 12d mostram eritrócitos modificados oxidativamente *in vitro* através do tratamento com diamida e diamida + H₂O₂ respectivamente, resultando em deformações morfológicas comparáveis com as alterações encontradas em eritrócitos de pacientes sépticos.

a)



Eritrócitos de paciente séptico

b)



Eritrócitos de voluntário sadio

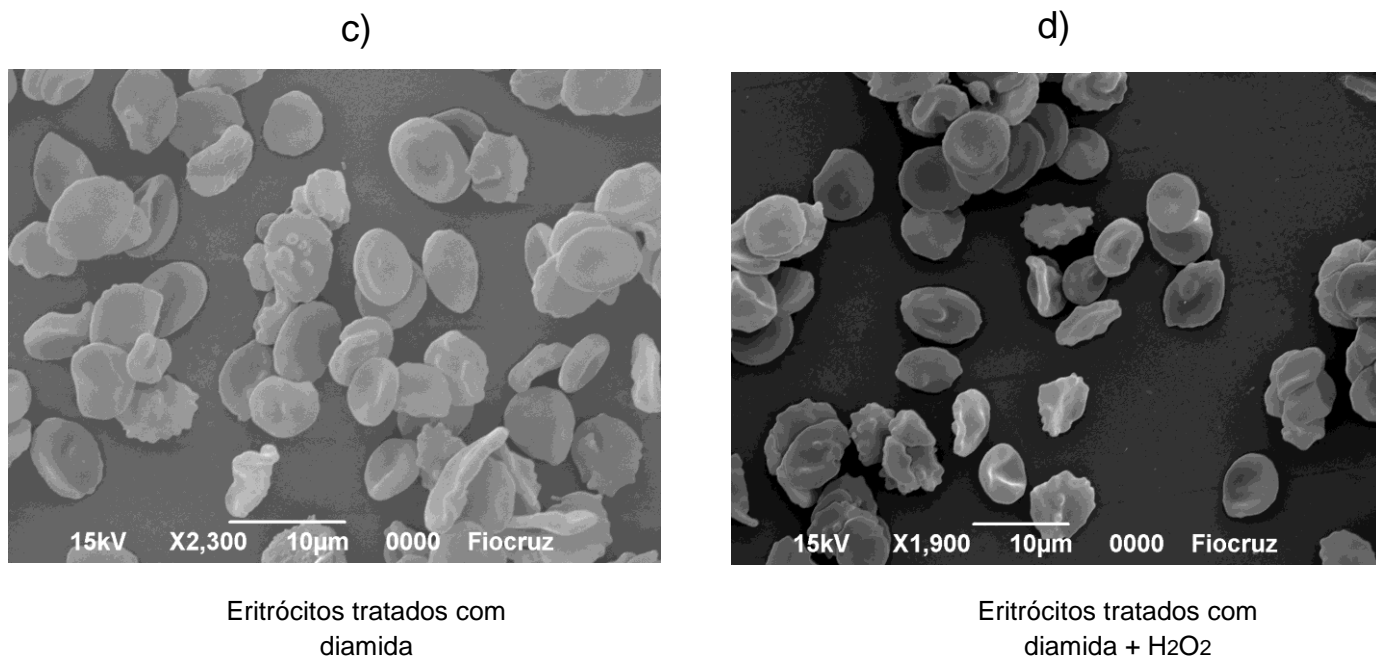


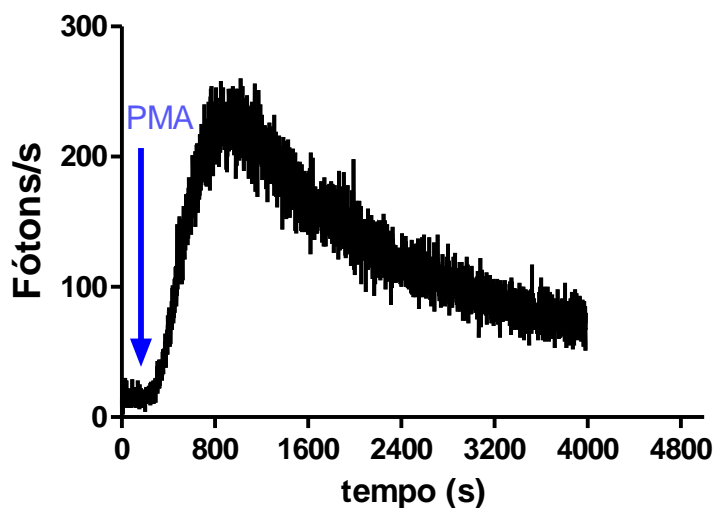
Figura 12: Visualização de eritrócitos por microscopia eletrônica de varredura. (a) Eritrócitos normais de voluntário sadio. (b) Eritrócitos modificados oxidativamente de pacientes sépticos com a presença de deformações morfológicas. (c) Eritrócitos modificados oxidativamente *in vitro* tratados com diamida e (d) diamida + H₂O₂, ambos se assemelham aos eritrócitos obtidos de pacientes sépticos.

7.6. PRODUÇÃO DE ROS PELOS MACRÓFAGOS J774 EM PRESENÇA DE ERITRÓCITOS

A figura 13a mostra que os macrófagos J774 estavam viáveis para produção de ROS evidenciado pelo aumento da contagem de fótons/segundo após estímulo com 2,04µM de PMA. Na figura 13b, observa-se um aumento da produção de ROS pelos macrófagos J774 durante o contato com os eritrócitos de paciente séptico. A adição de SOD à reação resultou na redução da emissão de fótons/segundo. Na figura 13c a contagem de fótons/segundo permaneceu em níveis basais correspondendo à produção de ROS pelos macrófagos J774 quando em contato com eritrócitos de voluntário sadio. Este fenômeno se inverteu após adição de PMA

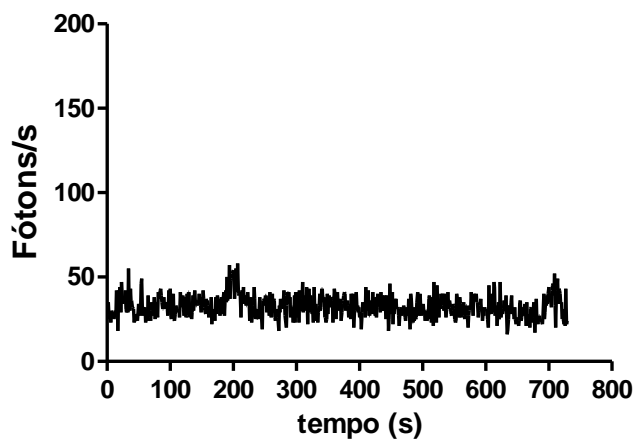
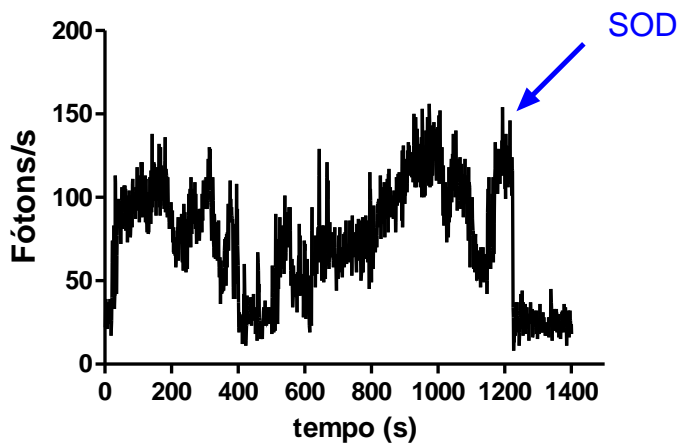
(2,04 μ M) à reação, mostrando que os macrófagos foram responsivos a ativação mesmo em presença de eritrócitos de voluntário sadio (figura 13d). A figura 13e mostra a produção de ROS pelos macrófagos J774 durante o contato com eritrócitos modificados oxidativamente *in vitro* comparável com a produção e oscilações de ROS obtidas em presença de eritrócitos de pacientes sépticos.

a)



b)

c)



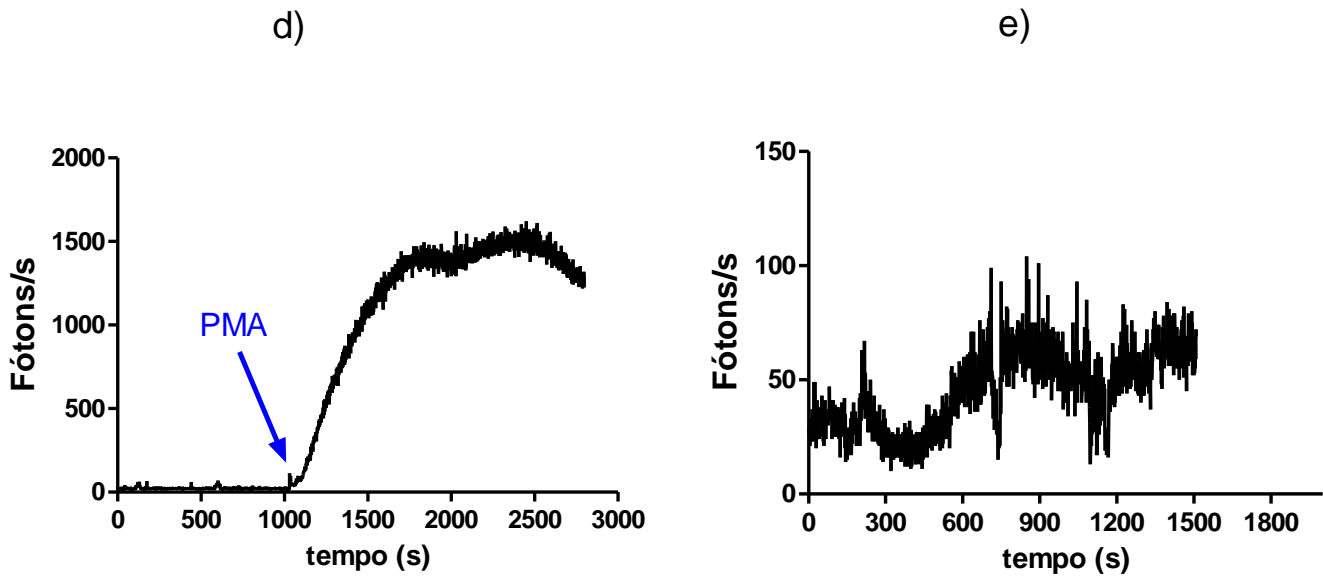
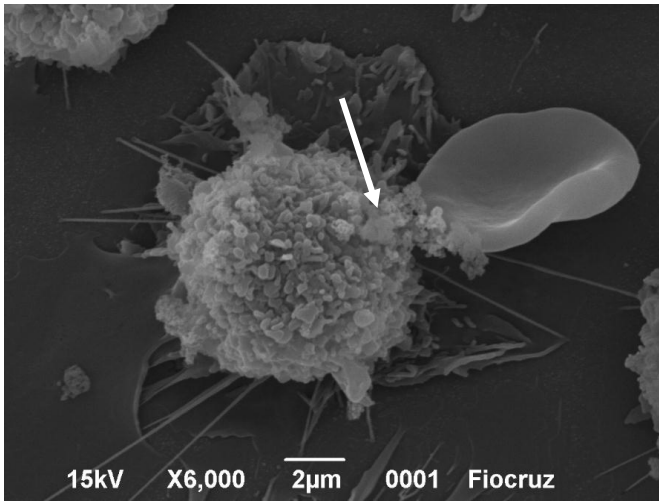


Figura 13: Produção de ROS pelos macrófagos J774 durante o contato com eritrócitos, medida por quimioluminescência dependente de L-012. (a) Os macrófagos J774 responderam ao estímulo de 2,04 μ M de PMA para produção de ROS. (b) Produção de ROS pelos macrófagos J774 em presença de eritrócitos de paciente séptico. (c) Contagem basal de fótons/segundo referente à produção de ROS pelos macrófagos J774 em presença de eritrócitos de voluntário sadio (d) Macrófagos J774 foram responsivos a ativação de 2,04 μ M de PMA mesmo em presença de eritrócitos de voluntário sadio. (e) Produção de ROS pelos macrófagos J774 em presença de eritrócitos modificados oxidativamente *in vitro* tratados com 105 μ M de ONOO $^-$. Resultado representativo de três pacientes.

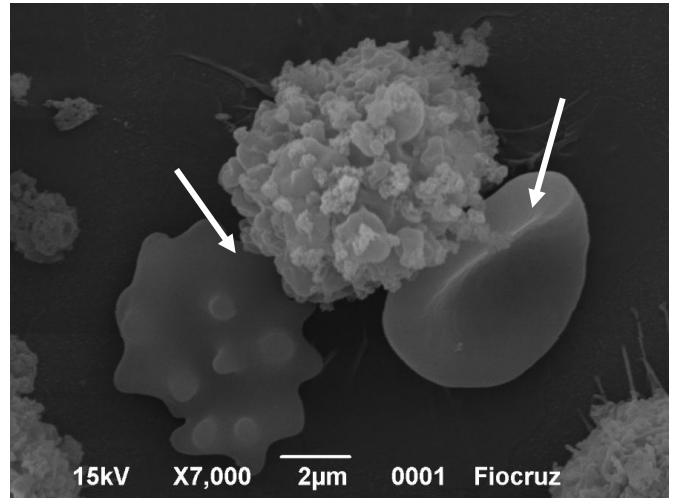
7.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO PROCESSO DE FAGOCITOSE PELOS MACRÓFAGOS J774

As figuras 14 a, b, c, d, e, f, g, h (setas) mostram por microscopia eletrônica de varredura as fases do processo de fagocitose dos eritrócitos modificados oxidativamente de pacientes sépticos pelos macrófagos J774. Esse processo visualizado com pacientes sépticos foi reproduzido com eritrócitos modificados oxidativamente *in vitro* (figura 14i). Diferentemente, os macrófagos J774 quando em contato com os eritrócitos normais de voluntário sadio não iniciaram o processo de fagocitose (figura 14j).

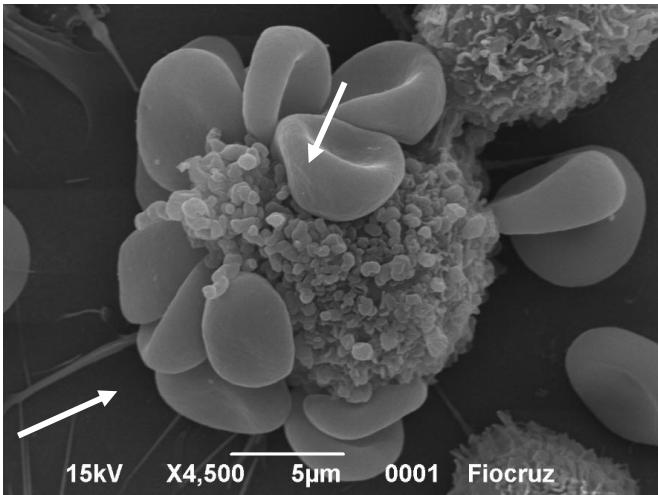
a)



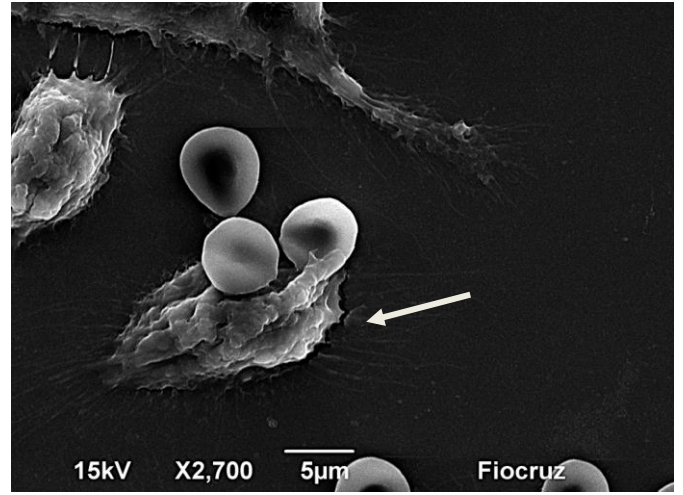
b)



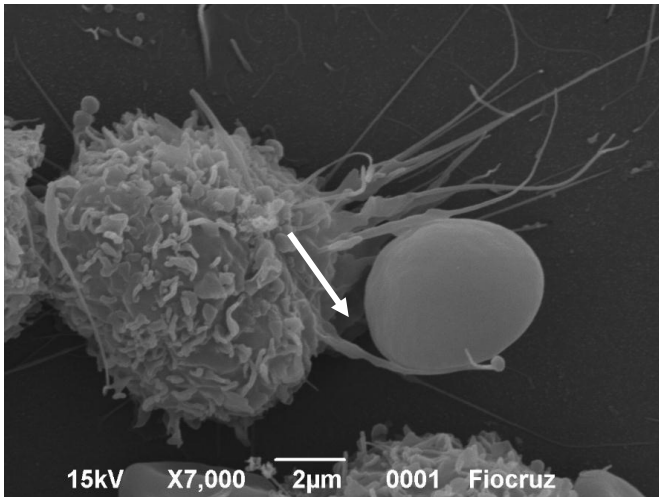
c)



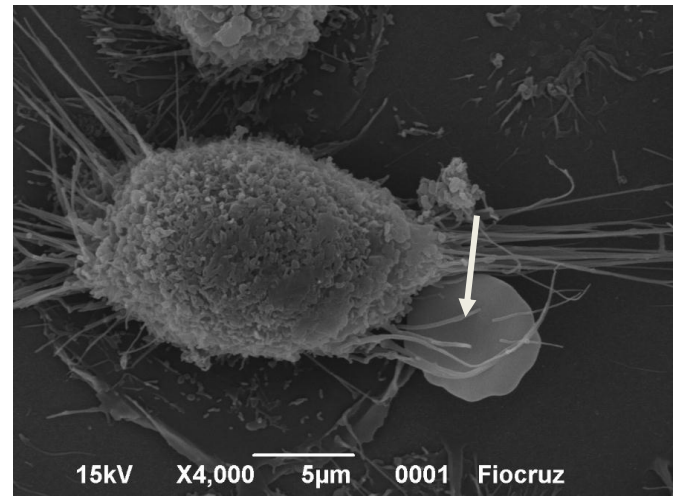
d)



e)



f)



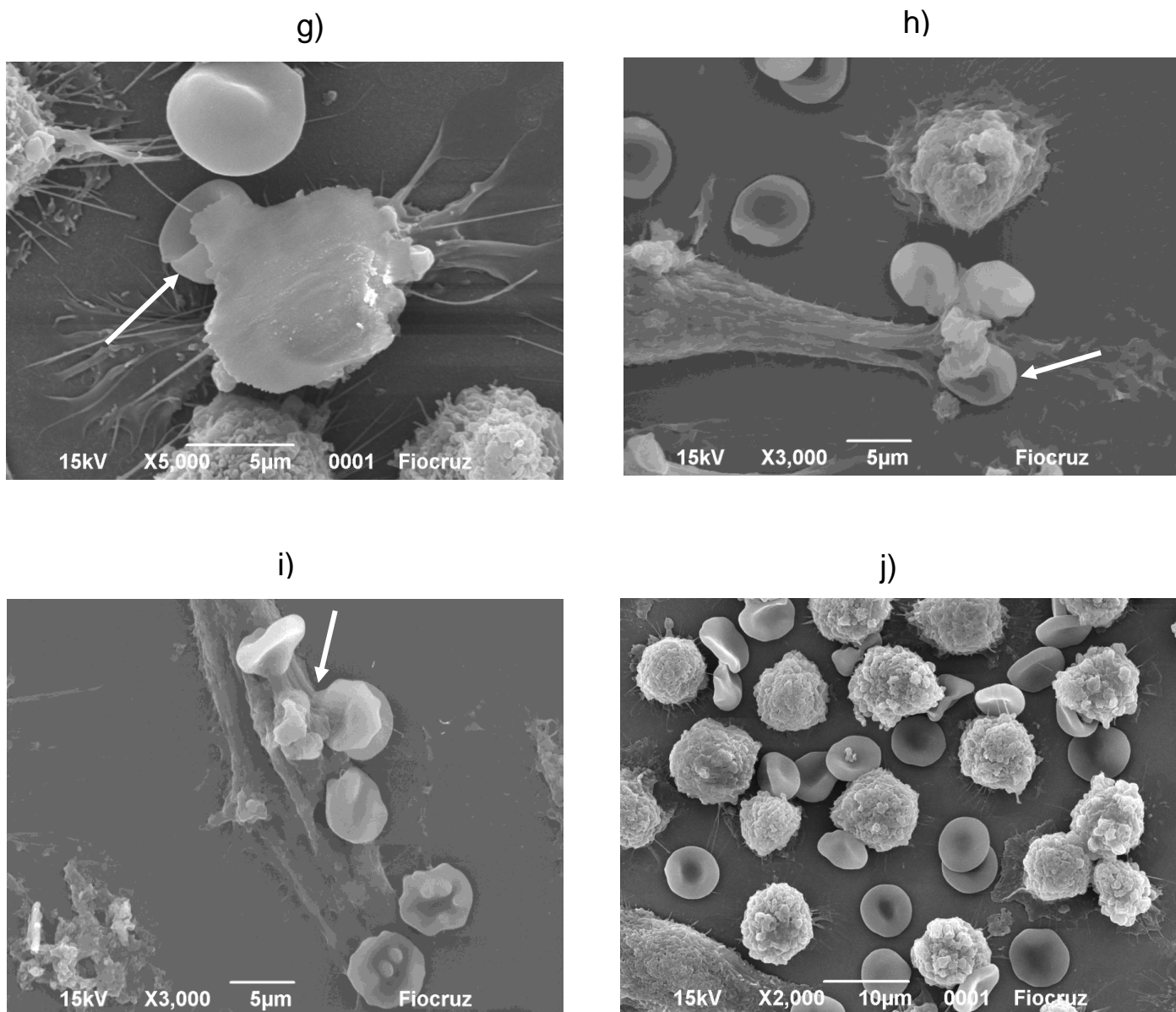


Figura 14: Visualização por microscopia eletrônica de varredura das fases do processo de fagocitose (setas) dos eritrócitos pelos macrófagos J774 que foram deixados juntos por 1 hora a 37°C e em seguida fixados com Karnovsky. (a,b,c,d,e,f,g,h) Adesão e fagocitose dos eritrócitos modificados oxidativamente de pacientes sépticos pelos macrófagos J774. (i) Macrófagos J774 fagocitando eritrócitos modificados oxidativamente in vitro. (j) Eritrócitos normais de voluntário sadio em presença de macrófagos J774.

7.8. EXPOSIÇÃO DA FOSFATIDILSERINA NA SUPERFÍCIE DOS ERITRÓCITOS MODIFICADOS OXIDATIVAMENTE

A figura 15 mostra que cerca de 20% ($22\% \pm 4$) dos eritrócitos de pacientes sépticos ($n=4$) ligaram-se a anexina V na presença de cálcio indicando a expressão da fosfatidilserina na sua superfície. Na ausência de cálcio, 1.5% ($1.8\% \pm 2$) desses eritrócitos se ligaram a anexina V. Por outro lado, cerca de 1.0% ($1.0\% \pm 2$) dos eritrócitos de voluntários sadios ($n=4$) ligaram a anexina V na presença de cálcio.

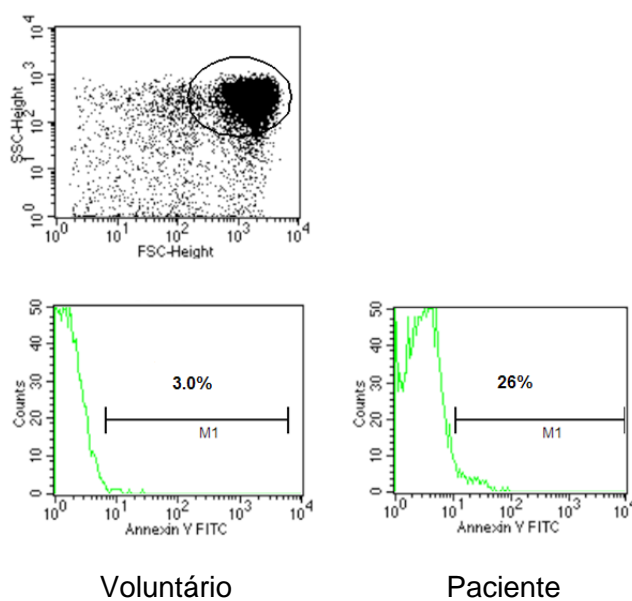
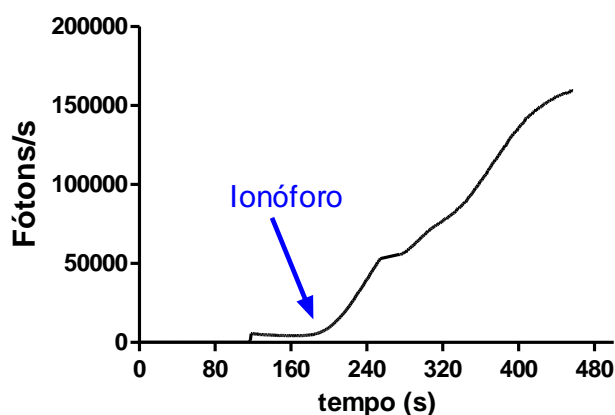


Figura 15: Comparação da expressão de fosfatidilserina entre paciente séptico e voluntário sadio indicada pela ligação da anexina V na presença de cálcio.

7.9. PRODUÇÃO DE ROS PELOS NEUTRÓFILOS EM PRESENÇA DE ERITRÓCITOS

Como demonstrado na figura 16a, os neutrófilos isolados do sangue total de voluntário sadio responderam ao estímulo de ionóforo de cálcio (A23187) (20 μ M) para produção de ROS, evidenciada pelo aumento da contagem de fótons/segundo que antes se encontrava no estado basal. Os neutrófilos produziram ROS três vezes mais durante o contato com eritrócitos de paciente séptico (figura 16b) do que durante o contato com eritrócitos de voluntário sadio (figura 16c). Esta produção de ROS foi reduzida após adição de SOD (9,04 μ M) à reação com eritrócitos de paciente séptico (figura 16b). Os neutrófilos também produziram ROS quando em contato com os eritrócitos modificados oxidativamente *in vitro* tratados com ONOO⁻ (Figura 16d) e ionóforo de cálcio (figura 16e) comparáveis com a produção de ROS em presença de eritrócitos de paciente séptico. A adição de SOD (9,04 μ M) à reação com ionóforo de cálcio (figura 16e) resultou na redução de fótons/segundo como visto na reação com paciente séptico.

a)



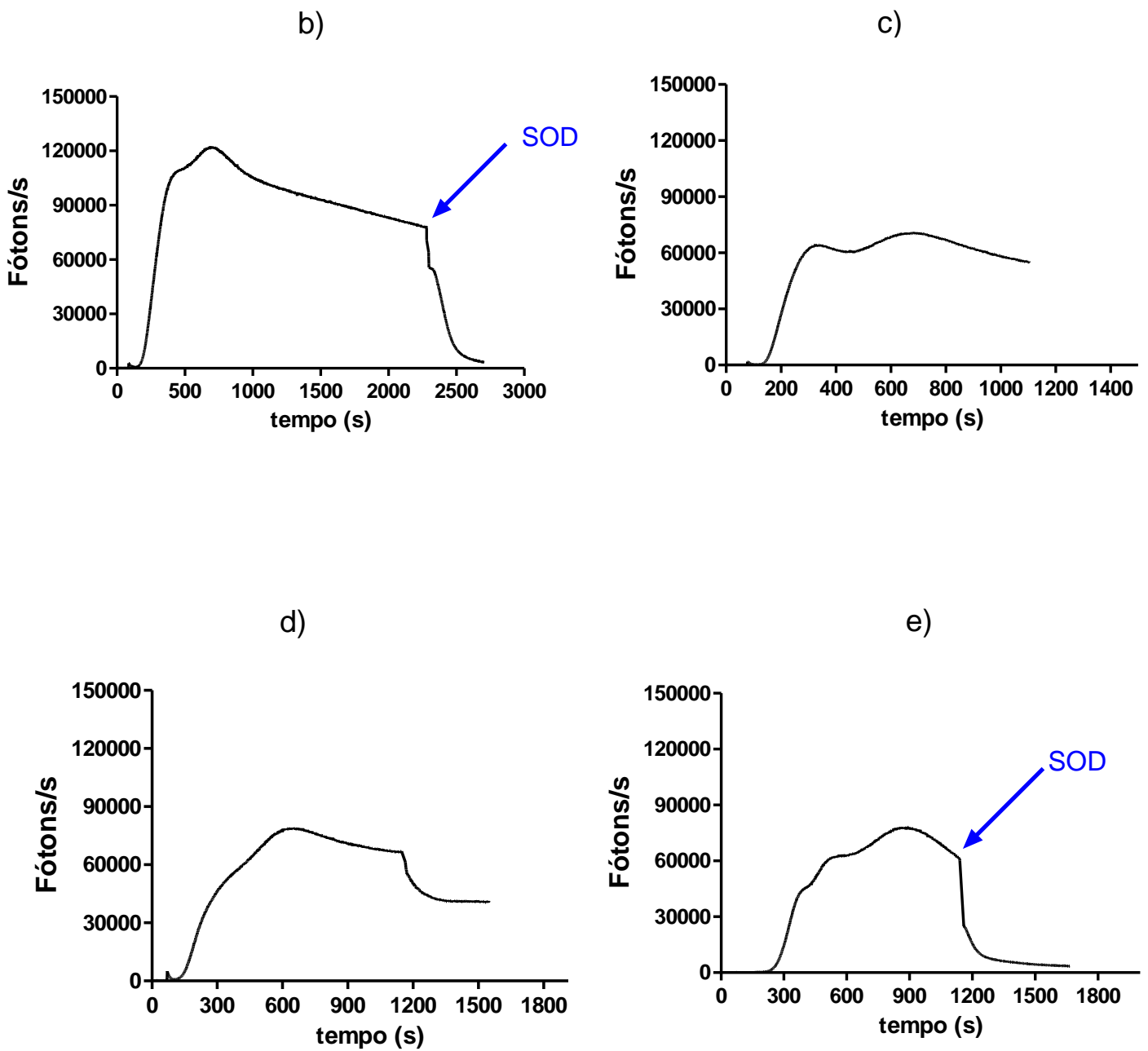
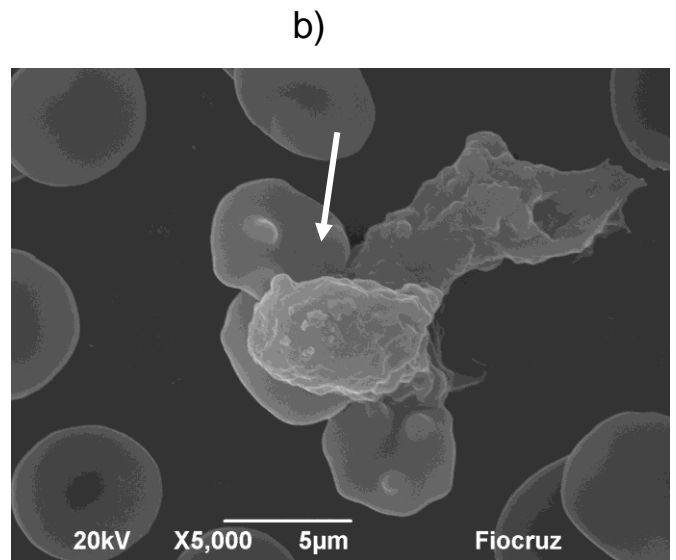
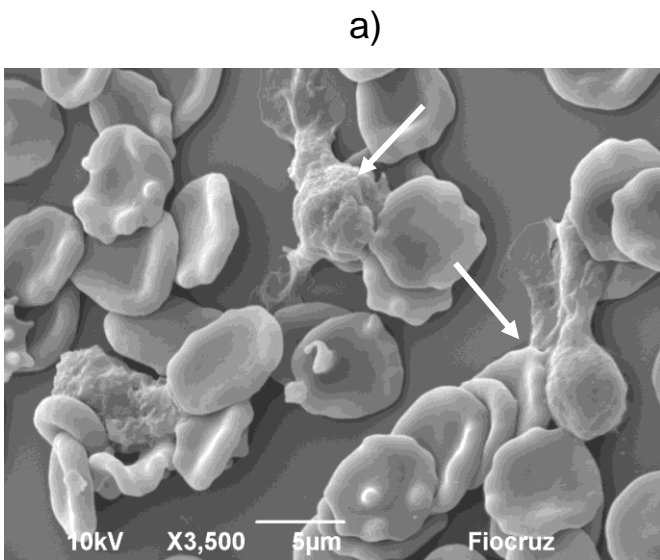


Figura 16: Produção de ROS pelos neutrófilos durante o contato com eritrócitos, medida por quimioluminescência dependente de L-012. (a) Os neutrófilos puros responderam ao estímulo de $2,04\mu\text{M}$ de PMA para produção de ROS. (b,c) Produção de ROS pelos neutrófilos em presença de eritrócitos de paciente séptico (b) comparado em presença de eritrócitos de voluntário sadio (c). Níveis basais de fótons/segundo após adição de $9,04\mu\text{M}$ de SOD à reação com eritrócitos de paciente séptico (b). Produção de ROS pelos neutrófilos durante o contato com eritrócitos modificados oxidativamente *in vitro* tratados separadamente com peróxido de nitrito ($105\mu\text{M}$) (d) e ionóforo de cálcio ($20\mu\text{M}$) (e). A adição de $9,04\mu\text{M}$ de SOD à reação de eritrócitos tratados com ionóforo de cálcio resultou na redução da emissão de fótons/segundo (e). Resultado representativo de três pacientes.

7.10. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO PROCESSO DE FAGOCITOSE PELOS NEUTRÓFILOS

A figura 17a mostra por microscopia eletrônica de varredura o início do processo de fagocitose de eritrócitos modificados oxidativamente de paciente séptico. O fenômeno se repetiu com eritrócitos modificados oxidativamente *in vitro* tratados com ONOO^- (figura 17b) e o mesmo não foi evidenciado com os eritrócitos de voluntário sadio (figura 17c).



c)

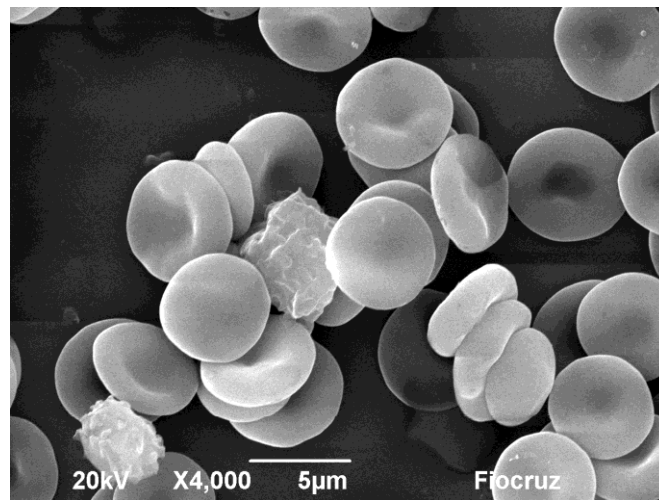


Figura 17: Visualização por microscopia eletrônica de varredura do processo de fagocitose dos eritrócitos pelos neutrófilos que foram deixados juntos por 1 hora a 37°C e em seguida fixados com Karnovsky. (a) Fagocitose dos eritrócitos modificados oxidativamente de paciente séptico pelos neutrófilos. (b) Fagocitose dos eritrócitos modificados oxidativamente *in vitro* pelos neutrófilos. (c) Eritrócitos normais de voluntário sadio em presença de neutrófilos.

8. DISCUSSÃO

A incidência elevada de mortalidade na sepse e a inefetividade dos tratamentos demonstrado em 77,7% de óbitos registrados nos pacientes deste estudo (tabela1) evidencia uma lacuna no conhecimento desse processo inflamatório exacerbado. Neste trabalho, nós focamos os mecanismos patológicos deletérios que ocorrem no primeiro estágio da sepse, isto é, no primeiro encontro dos neutrófilos com bactérias e “produtos bacterianos” que envolve produção de ROS (Babior, Kipnes et al. 1973) uma vez que o mecanismo necessário que é a secreção de MPO na membrana (Klebanoff 1970) e montagem da NADPH oxidase

(Griffin, Griffin et al. 1975) não depende de síntese proteica já que os elementos se encontram nos neutrófilos. Esses neutrófilos que constituem a primeira linha de defesa do organismo vão fagocitar e degradar continuamente os patógenos que os ativaram seguidos de um processo de morte celular induzida por fagocitose dependente do aumento da produção de ROS (Watson, Redmond et al. 1996). Posteriormente, as citocinas que dependem de síntese proteica poderiam atenuar a produção de ROS, mas este efeito não foi constatado no caso em estudo.

A ativação dos neutrófilos pode ir além do efeito bactericida inicial e permanecer com efeitos nocivos como destruição tecidual numa fase prolongada do processo inflamatório não controlado. Essa fase é mostrada nesse trabalho pelo efeito pró-inflamatório dos eritrócitos modificados pelo estresse oxidativo que quando produzidos são responsáveis pela ativação contínua dos neutrófilos com produção crescente de ROS gerando assim um mecanismo de “feedback positivo”. Este mecanismo caracteriza a patologia típica de sepse/choque séptico que é constituída por alteração da coagulação, expressão de NADPH oxidase no endotélio, decréscimo da deformabilidade dos eritrócitos, aumento do hematócrito capilar, deficiência circulatória e danos em órgãos (Crowther and Marshall 2001).

Dentre as técnicas desenvolvidas nesse projeto, ressalta-se a medição de ROS em sangue total de pacientes sépticos que tem um possível valor como marcador de gravidade da sepse.

A confirmação de que a quimioluminescência dependente do L-012, emissor secundário de luz, de maior sensibilidade do que o luminol/isoluminol aos produtos oxidativos de curta duração, nos permitiu mensurar em tempo real a produção de ROS em amostras de sangue total heparinizado de pacientes sépticos sem nenhuma separação prévia.

Surpreendentemente, pacientes sépticos apresentaram níveis elevados de oxidantes no sangue total quando comparado com voluntários sadios mensurados por quimioluminescência dependente de L-012, uma vez que as proteínas plasmáticas são removedoras (scavenger) muito eficientes de ROS, (Winterbourn 1985) os quais causam luminescência com emissores secundários de luz. Isso demonstra a alta eficiência do L-012 como emissor secundário de luz.

Esses oxidantes tiveram seus níveis reduzidos pela presença de inibidores como hidralazina e desferroxamina, os quais agem inibindo especificamente o radical peróxido de nitrito, comprovando assim que este radical é um dos componentes do estresse oxidativo ocorrendo no sangue total (Denicola, Souza et al. 1995; Daiber, Oelze et al. 2005).

Foram usados também como inibidores o SOD que destrói o precursor da reação que forma o peróxido de nitrito, o radical superóxido, porém, não altera o substrato da MPO. A adição posterior de azida sódica inibiu peroxidases (Klebanoff 1970) presente na reação. Os neutrófilos presentes no sangue total de voluntários sadios estavam aptos a produzirem ROS, que foi demonstrado pela responsividade dessas células à ativação com PMA.

Seguindo uma linha já estabelecida no nosso grupo por Thayna Meirelles resolvemos investigar a presença de micropartículas, produto da ativação ocorrida durante o processo inflamatório em monócitos e principalmente neutrófilos.

Como já demonstrado pelo grupo, essas micropartículas contêm a enzima MPO a qual produz diversos oxidantes poderosos e modificadores de proteína (clorinação, brominação) em presença do seu substrato peróxido de hidrogênio. Essa enzima é reconhecida como principal fator bactericida das células inflamatórias circulantes, sobretudo neutrófilos (Klebanoff 1967).

Em nosso estudo, as micropartículas foram definidas como mieloperoxidase insolúvel (MPOi) quando precipitadas a 100.000 g por 45 minutos. Foi demonstrado aumento significativo da concentração de MPOi presente em circulação dos pacientes sépticos, o que não foi visto nos voluntários saudáveis.

Esse estudo preliminar apesar de claramente demonstrar a ligação entre MPOi e sepse, não permite ainda nesses estágios iniciais estabelecer uma correlação direta da elevação da MPOi e gravidade da sepse.

Embora, valha a pena ressaltar que o paciente com níveis extraordinários de MPOi, o que pode ser explicado pela acentuada neutrofilia presente na fase aguda, assim como o paciente no qual a MPOi permaneceu elevada por dias consecutivos foram a óbito, evidenciando o papel da MPO no dano tecidual-sistêmico. Esses dois resultados discutidos acima são indicadores claros do processo oxidativo severo ocorrendo nesses pacientes sépticos.

Demonstramos que em sepse, ROS resultante do processo inflamatório promove modificações morfológicas dos eritrócitos com aparecimento de acantócitos, esferócitos, “cup shape” e, sobretudo equinócitos.

Esses eritrócitos modificados oxidativamente foram visualizados em amostras de sangue de pacientes sépticos por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura como também *in vitro* após tratar os eritrócitos com diamida e diamida associada com peróxido de hidrogênio, já que a diamida é conhecida por oxidar pequenas moléculas de tiol (Kosower and Kosower 1995). Em amostras de sangue de voluntários saudáveis não foram encontradas essas formas de eritrócitos.

Essas alterações morfológicas são resultantes da peroxidação de lipídios e modificações das proteínas citoplasmáticas principalmente integrinas e

aminofosfolipídios que levam a desestruturação da membrana celular (Tyurina, Basova et al. 2007).

A observação por microscopia óptica de contraste de fase da adesão na placa de Petri de neutrófilos presentes no sangue de pacientes sépticos confirma a prévia ativação desses neutrófilos.

Os eritrócitos além do transporte de O_2 e CO_2 amplamente reconhecido e agora sabendo do transporte de NO que causa relaxamento da microvasculatura (Stamler, Simon et al. 1992), também, são os maiores reservatórios de antioxidantes circulantes no organismo. (Minetti and Malorni 2006). O estresse oxidativo causado pela sepse oxidaria esse NO a $ONOO^-$ contribuindo, portanto, para um decréscimo do fator antiaderente conferido pelo NO.

A oxidação dos eritrócitos causa além da ativação de neutrófilos um transporte deficitário de oxigênio (formação de metahemoglobina) e diminuição da elasticidade desses eritrócitos gerando como consequência uma disfunção na microcirculação, podendo progredir para falência múltipla de órgãos (Jia, Bonaventura et al. 1996).

Para testar as hipóteses sugeridas com experimentos com pacientes sépticos, ou seja, eritrócitos modificados oxidativamente ativando células inflamatórias, nós ativamos macrófagos de linhagem J774 com eritrócitos de pacientes sépticos e eritrócitos modificados por estresse oxidativo *in vitro*.

Este modelo foi avaliado por medição em tempo real de ROS como visualização por microscopia eletrônica de varredura. Esses macrófagos são ativados para produção de ROS por PMA mostrando a capacidade destas células de elicitar estresse oxidativo. Usando tanto eritrócitos de pacientes sépticos como eritrócitos modificados oxidativamente *in vitro* com $ONOO^-$, constatou-se um

aumento da produção de ROS nesses sistemas que foram eliminados na presença de SOD. Este fato pode ser visto em microscopia eletrônica de varredura no qual se observa claramente que os eritrócitos de pacientes sépticos e os eritrócitos modificados oxidativamente *in vitro* são encontrados aderidos e no processo de fagocitose pelos J774, o que não foi visualizado em eritrócitos de voluntários sadios.

Vale ressaltar que estas células visualizadas na microscopia eletrônica foram as mesmas que produziram ROS mostrando que desde o início do processo de fagocitose (contato) inicia-se o estresse oxidativo.

Demonstramos a presença de fosfatidilserina na superfície de eritrócitos de pacientes sépticos. Isto confirma o processo de oxidação, perda de assimetria de membrana e peroxidação de lipídios que são características do processo de eriptose (Lang, Lang et al. 2005).

Essa produção de espécies reativas por neutrófilos ficou bem evidenciada quando se utilizou neutrófilos isolados em presença de eritrócitos de pacientes sépticos, voluntários sadios e eritrócitos modificados oxidativamente *in vitro*. Esses neutrófilos que eram viáveis e capazes de produzir ROS quando ativados com ionóforo de cálcio, também fazia o mesmo se o estímulo fosse substituído por eritrócitos de pacientes sépticos ou eritrócitos modificados oxidativamente *in vitro* tratados com peróxido de nitrito ou ionóforo de cálcio. Com eritrócitos de voluntários sadios, o fenômeno aconteceu em muito menor grau.

Numa análise dos produtos oxidativos, foi demonstrado que superóxido foi produzido após estímulo com eritrócitos de pacientes sépticos e com eritrócitos modificados *in vitro*. Confirma-se que assim como macrófagos J774, os neutrófilos também são estimulados por contato com eritrócitos modificados oxidativamente. Esses neutrófilos foram visualizados em microscopia eletrônica de varredura e

demonstraram uma adesão como também o início do processo de fagocitose dos eritrócitos de paciente séptico e eritrócitos modificados oxidativamente *in vitro*. O mesmo não foi visualizado em eritrócitos de voluntários sadios. Os experimentos dessa fase inicial não foram desenhados para ver a fagocitose completa, mas as imagens em microscopia eletrônica de varredura foram obtidas dos mesmos neutrófilos que foram medidos ROS.

Esses eritrócitos modificados oxidativamente *in vivo* e *in vitro* mostraram ser um poderoso sinal para produção de ROS por neutrófilos. Isso mostra que o processo de oxidação *in vitro* ou *in vivo* o qual produz eritrócitos modificados oxidativamente poderia desencadear ou manter o processo inflamatório através de ROS.

Esses experimentos tomados como conjunto mostra que a resposta oxidativa inicial causada por bactérias e principalmente produtos bacterianos levaria a produção de ROS os quais amplificariam esse processo oxidativo pelos eritrócitos modificados oxidativamente.

Este trabalho descreve pela primeira vez um possível mecanismo de “feedback positivo” que através de um microambiente pró-oxidativo formado por ROS contribui para ativação de novos neutrófilos recrutados, mesmo com bactérias indetectáveis no sangue, como demonstrado em resultados de culturas de pacientes sépticos (anexo).

Nossos resultados com pacientes sépticos de certa maneira ajudam a clarear o problema do alto índice de mortalidade em sepse, uma vez que, o processo desencadeado pela inflamação persiste além da presença de patógenos. Esses efeitos exacerbam e prolongam a produção de ROS no sistema circulatório.

Nós sugerimos que a remoção efetiva das espécies oxidativas por inibidores e antioxidantes coadjuvantes à antibioticoterapia, seria a melhor maneira de intervir terapêuticamente nessa patologia.

O problema do uso de antioxidante seria estar na concentração certa, no local certo e na hora certa e isso limita o uso dos antioxidantes naturais mais usados como: vitamina C e vitamina E. Mas a possibilidade de variedades de compostos usados nesse estudo como desferroxamina e hidralazina significa que estudos direcionados poderiam trazer novas descobertas terapêuticas.

Inibidores específicos de MPO e/ou removedores de ONOO^- deveriam ser investigados com o objetivo de controlar a sepse. Talvez um antioxidante natural e renovável como GSH ligado ao radical etil que o torna permeável seria recomendável. Mas, o processo tem que ser entendido em maiores detalhes, principalmente no que concerne ao NO.

9. CONCLUSÕES

Com os resultados apresentados neste trabalho, conclui-se que:

- Danos oxidativos superam a defesa e reparo dos anti-oxidantes nos pacientes sépticos;
- ROS e MPOi em circulação são indicadores do processo oxidativo de pacientes sépticos;
- Eritrócitos de pacientes sépticos são modificados por estresse oxidativo;

- Eritrócitos modificados oxidativamente in vivo e in vitro por ROS contribuem para formação do microambiente pró-oxidativo promovendo a ativação das células inflamatórias.

10. ANEXO

RESULTADOS DE CULTURAS OBTIDOS DE PACIENTES SÉPTICOS

Data da coleta	Culturas
Paciente 1 – 16/11	20/10 - Hemocultura 1º - <i>Candida albicans</i> 26/10 – Hemocultura 2º - <i>Candida albicans</i> 03/11 – Urocultura – <i>Candida glabrata</i> 16/11 - Hemocultura 1º - negativa Hemocultura 2º - negativa 22/11 – Hemocultura - negativa
Paciente 2 - 26/10	18 /10 – Hemocultura - <i>Escherichia coli</i> 24/10 – Hemocultura - <i>Escherichia coli</i> 26/10 – Hemocultura - negativa 03/11 – Hemocultura 1º - negativa 03/11 – Hemocultura 2º - negativa
Paciente 3 – 20/10	15/10- Hemocultura 1º e 2º - <i>Staphylococcus epidermidis</i> 20/10- Hemocultura 1º - negativa Hemocultura 2º - negativa
Paciente 4 – 15/09	14/09 – Hemocultura - <i>Acinetobacter baumannii</i> 14/09- Cultura de swab axilar - <i>Staphylococcus</i> sp. 14/09 - Cultura de swab oral - <i>Streptococcus</i> sp. 15/09 – Hemocultura 1º e 2º - negativa
Paciente 5 – 15/09	09/09 – Cultura de secreção traqueal- <i>Escherichia coli</i> 09/09 – Urocultura - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 10/09 – Hemocultura 1º - <i>Enterobacter</i> sp. 14/09 – Urocultura - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 14/09 – Hemocultura 2º - <i>Enterobacter cloacae</i> 15/09 – Hemocultura negativa

<p>Paciente 6 – 10/11</p>	<p>29/09 – Gram - <i>Staphylococcus</i> sp. 05/11 – Hemocultura 1^o - <i>Staphylococcus</i> sp. 05/11 – Hemocultura 2^o - <i>Staphylococcus</i> sp. 08/11 – Secreção de líquido abdominal - negativa 09/11 – Hemocultura - negativa 10/11 – Hemocultura - negativa</p>
<p>Paciente 7 – 10/11</p>	<p>04/11 – Urocultura - negativa 05/11 – Hemocultura 1^o - <i>Escherichia coli</i> 05/11 – Hemocultura 2^o - <i>Escherichia coli</i> 10/11 – Hemocultura - negativa</p>

11. REFERÊNCIAS

- Abdala-Valencia, H., J. Earwood, et al. (2007). "Nonhematopoietic NADPH oxidase regulation of lung eosinophilia and airway hyperresponsiveness in experimentally induced asthma." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **292**(5): L1111-1125.
- Aird, W. C. (2003). "The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome." Blood **101**(10): 3765-3777.
- Aird, W. C. (2004). "Endothelium as an organ system." Crit Care Med **32**(5 Suppl): S271-279.
- Alayash, A. I., R. P. Patel, et al. (2001). "Redox reactions of hemoglobin and myoglobin: biological and toxicological implications." Antioxid Redox Signal **3**(2): 313-327.
- Albano, E. (2006). "Alcohol, oxidative stress and free radical damage." Proc Nutr Soc **65**(3): 278-290.
- Alvarez, B. and R. Radi (2003). "Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins." Amino Acids **25**(3-4): 295-311.
- Annane, D., E. Bellissant, et al. (2005). "Septic shock." Lancet **365**(9453): 63-78.
- Babior, B. M. (1984). "The respiratory burst of phagocytes." J Clin Invest **73**(3): 599-601.
- Babior, B. M. (2000). "Phagocytes and oxidative stress." Am J Med **109**(1): 33-44.
- Babior, B. M., R. S. Kipnes, et al. (1973). "Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent." J Clin Invest **52**(3): 741-744.
- Ballatori, N., S. M. Krance, et al. (2009). "Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases." Biol Chem **390**(3): 191-214.
- Barnes, P. J. (2000). "Chronic obstructive pulmonary disease." N Engl J Med **343**(4): 269-280.
- Beckman, J. S., T. W. Beckman, et al. (1990). "Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(4): 1620-1624.

- Berckmans, R. J., R. Nieuwland, et al. (2001). "Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation." Thromb Haemost **85**(4): 639-646.
- Boas, F. E., L. Forman, et al. (1998). "Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 3077-3081.
- Bogdan, C. (2001). "Nitric oxide and the immune response." Nat Immunol **2**(10): 907-916.
- Bokoch, G. M. and T. Zhao (2006). "Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac GTPase." Antioxid Redox Signal **8**(9-10): 1533-1548.
- Bone, R. C., R. A. Balk, et al. (1992). "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine." Chest **101**(6): 1644-1655.
- Bookchin, R. M., O. E. Ortiz, et al. (1987). "Activation of calcium-dependent potassium channels in deoxygenated sickled red cells." Prog Clin Biol Res **240**: 193-200.
- Brun-Buisson, C., F. Doyon, et al. (1995). "Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis." JAMA **274**(12): 968-974.
- Bulbarelli, A., A. Valentini, et al. (1998). "An erythroid-specific transcript generates the soluble form of NADH-cytochrome b5 reductase in humans." Blood **92**(1): 310-319.
- Chan, P. Y. and A. Aruffo (1993). "VLA-4 integrin mediates lymphocyte migration on the inducible endothelial cell ligand VCAM-1 and the extracellular matrix ligand fibronectin." J Biol Chem **268**(33): 24655-24664.
- Chapman, A. L., M. B. Hampton, et al. (2002). "Chlorination of bacterial and neutrophil proteins during phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*." J Biol Chem **277**(12): 9757-9762.
- Chesney, J. A., J. W. Eaton, et al. (1996). "Bacterial glutathione: a sacrificial defense against chlorine compounds." J Bacteriol **178**(7): 2131-2135.

- Closse, C., J. Dachary-Prigent, et al. (1999). "Phosphatidylserine-related adhesion of human erythrocytes to vascular endothelium." Br J Haematol **107**(2): 300-302.
- Cook-Mills, J. M., J. D. Johnson, et al. (2004). "Calcium mobilization and Rac1 activation are required for VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) stimulation of NADPH oxidase activity." Biochem J **378**(Pt 2): 539-547.
- Cook-Mills, J. M., M. Marchese, et al. (2010). "VCAM-1 Expression and Signaling during Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants." Antioxid Redox Signal.
- Crowther, M. A. and J. C. Marshall (2001). "Continuing challenges of sepsis research." JAMA **286**(15): 1894-1896.
- Daiber, A., M. Oelze, et al. (2005). "Hydralazine is a powerful inhibitor of peroxynitrite formation as a possible explanation for its beneficial effects on prognosis in patients with congestive heart failure." Biochem Biophys Res Commun **338**(4): 1865-1874.
- Daugherty, A., J. L. Dunn, et al. (1994). "Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions." J Clin Invest **94**(1): 437-444.
- De Backer, D., J. Creteur, et al. (2002). "Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis." Am J Respir Crit Care Med **166**(1): 98-104.
- Deem, T. L. and J. M. Cook-Mills (2004). "Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) activation of endothelial cell matrix metalloproteinases: role of reactive oxygen species." Blood **104**(8): 2385-2393.
- DeLeo, F. R. (2004). "Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens." Apoptosis **9**(4): 399-413.
- DeLeve, L. D. and N. Kaplowitz (1990). "Importance and regulation of hepatic glutathione." Semin Liver Dis **10**(4): 251-266.
- Denicola, A., J. M. Souza, et al. (1995). "Desferrioxamine inhibition of the hydroxyl radical-like reactivity of peroxynitrite: role of the hydroxamic groups." Free Radic Biol Med **19**(1): 11-19.
- Denicola, A., J. M. Souza, et al. (1998). "Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3566-3571.

- Dupuis, F., S. Levasseur, et al. (1997). "Production, metabolism and effect of platelet-activating factor on the growth of the human K562 erythroid cell line." Biochim Biophys Acta **1359**(3): 241-249.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (2000). "A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells." Nature **405**(6782): 85-90.
- Feelisch, M. and E. A. Noack (1987). "Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase." Eur J Pharmacol **139**(1): 19-30.
- Franco, R. S., M. Palascak, et al. (1996). "Dehydration of transferrin receptor-positive sickle reticulocytes during continuous or cyclic deoxygenation: role of KCl cotransport and extracellular calcium." Blood **88**(11): 4359-4365.
- Galli, F., R. Rossi, et al. (2002). "Protein thiols and glutathione influence the nitric oxide-dependent regulation of the red blood cell metabolism." Nitric Oxide **6**(2): 186-199.
- Gasser, O. and J. A. Schifferli (2005). "Microparticles released by human neutrophils adhere to erythrocytes in the presence of complement." Exp Cell Res **307**(2): 381-387.
- Goldstein, S., D. Meyerstein, et al. (1997). "Mechanisms of Reactions of (*)NO with Complexes with Metal-Carbon sigma-Bonds and with Aliphatic Radicals." Inorg Chem **36**(13): 2893-2897.
- Goode, H. F., H. C. Cowley, et al. (1995). "Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction." Crit Care Med **23**(4): 646-651.
- Griffin, F. M., Jr., J. A. Griffin, et al. (1975). "Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane." J Exp Med **142**(5): 1263-1282.
- Griffith, O. W. (1999). "Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis." Free Radic Biol Med **27**(9-10): 922-935.
- Gulbins, E., A. Jekle, et al. (2000). "Physiology of apoptosis." Am J Physiol Renal Physiol **279**(4): F605-615.
- Hansson, M., I. Olsson, et al. (2006). "Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase." Arch Biochem Biophys **445**(2): 214-224.

- Henneke, P. and D. T. Golenbock (2002). "Innate immune recognition of lipopolysaccharide by endothelial cells." Crit Care Med **30**(5 Suppl): S207-213.
- Herzenberg, L. A., S. C. De Rosa, et al. (1997). "Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1967-1972.
- Hibbs, J. B., Jr., R. R. Taintor, et al. (1988). "Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule." Biochem Biophys Res Commun **157**(1): 87-94.
- Hiramatsu, K. and S. Arimori (1988). "Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemia and diabetes." Diabetes **37**(6): 832-837.
- Huet, O., L. Dupic, et al. (2011). "Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis." Front Biosci **16**: 1986-1995.
- Iademarco, M. F., J. J. McQuillan, et al. (1992). "Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)." J Biol Chem **267**(23): 16323-16329.
- Ichinose, M., H. Sugiura, et al. (2000). "Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways." Am J Respir Crit Care Med **162**(2 Pt 1): 701-706.
- Ignarro, L. J. (2002). "Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview." J Physiol Pharmacol **53**(4 Pt 1): 503-514.
- Ignarro, L. J., R. E. Byrns, et al. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical." Circ Res **61**(6): 866-879.
- Ignarro, L. J., H. Lipton, et al. (1981). "Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates." J Pharmacol Exp Ther **218**(3): 739-749.
- Jia, L., C. Bonaventura, et al. (1996). "S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control." Nature **380**(6571): 221-226.
- Jiang, Q., D. A. Griffin, et al. (1997). "Intraphagosomal chlorination dynamics and yields determined using unique fluorescent bacterial mimics." Chem Res Toxicol **10**(10): 1080-1089.

- Kaplowitz, N., T. Y. Aw, et al. (1985). "The regulation of hepatic glutathione." Annu Rev Pharmacol Toxicol **25**: 715-744.
- Kilbourn, R. G., D. L. Traber, et al. (1997). "Nitric oxide and shock." Dis Mon **43**(5): 277-348.
- Kim, S. Y., M. A. Johnson, et al. (2005). "Neutrophils are associated with capillary closure in spontaneously diabetic monkey retinas." Diabetes **54**(5): 1534-1542.
- Klebanoff, S. J. (1967). "Iodination of bacteria: a bactericidal mechanism." J Exp Med **126**(6): 1063-1078.
- Klebanoff, S. J. (1968). "Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system." J Bacteriol **95**(6): 2131-2138.
- Klebanoff, S. J. (1970). "Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes." Science **169**(950): 1095-1097.
- Kobayashi, S. D., J. M. Voyich, et al. (2004). "Gene expression profiling provides insight into the pathophysiology of chronic granulomatous disease." J Immunol **172**(1): 636-643.
- Kosower, N. S. and E. M. Kosower (1995). "Diamide: an oxidant probe for thiols." Methods Enzymol **251**: 123-133.
- Lalor, P. F., P. Shields, et al. (2002). "Recruitment of lymphocytes to the human liver." Immunol Cell Biol **80**(1): 52-64.
- Lang, C. A., B. J. Mills, et al. (2000). "Blood glutathione decreases in chronic diseases." J Lab Clin Med **135**(5): 402-405.
- Lang, K. S., C. Duranton, et al. (2003). "Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes." Cell Death Differ **10**(2): 249-256.
- Lang, K. S., P. A. Lang, et al. (2005). "Mechanisms of suicidal erythrocyte death." Cell Physiol Biochem **15**(5): 195-202.
- Lang, K. S., S. Myssina, et al. (2003). "Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **367**(4): 391-396.
- Lang, P. A., U. Warskulat, et al. (2003). "Blunted apoptosis of erythrocytes from taurine transporter deficient mice." Cell Physiol Biochem **13**(6): 337-346.
- Liu, X., M. J. Miller, et al. (1998). "Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes." J Biol Chem **273**(30): 18709-18713.

- Lu, S. C. (2000). "Regulation of glutathione synthesis." Curr Top Cell Regul **36**: 95-116.
- Mallat, Z., H. Benamer, et al. (2000). "Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes." Circulation **101**(8): 841-843.
- Mareni, C. and G. F. Gaetani (1976). "NADP+ and NADPH in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes under oxidative stimulation." Biochim Biophys Acta **430**(3): 395-398.
- Marui, N., M. K. Offermann, et al. (1993). "Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells." J Clin Invest **92**(4): 1866-1874.
- Matarrese, P., E. Straface, et al. (2005). "Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases." FASEB J **19**(3): 416-418.
- Meister, A. and M. E. Anderson (1983). "Glutathione." Annu Rev Biochem **52**: 711-760.
- Miedel, M. C., J. D. Hulmes, et al. (1989). "The use of fluorescamine as a detection reagent in protein microcharacterization." J Biochem Biophys Methods **18**(1): 37-52.
- Minetti, M., L. Agati, et al. (2007). "The microenvironment can shift erythrocytes from a friendly to a harmful behavior: pathogenetic implications for vascular diseases." Cardiovasc Res **75**(1): 21-28.
- Minetti, M., T. L. Leto, et al. (2008). "Radical generation and alterations of erythrocyte integrity as bioindicators of diagnostic or prognostic value in COPD?" Antioxid Redox Signal **10**(4): 829-836.
- Minetti, M. and W. Malorni (2006). "Redox control of red blood cell biology: the red blood cell as a target and source of prooxidant species." Antioxid Redox Signal **8**(7-8): 1165-1169.
- Minetti, M., D. Pietraforte, et al. (2000). "Scavenging of peroxynitrite by oxyhemoglobin and identification of modified globin residues." Biochemistry **39**(22): 6689-6697.

- Moncada, S. and E. A. Higgs (1991). "Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance." Eur J Clin Invest **21**(4): 361-374.
- Moncada, S., R. M. Palmer, et al. (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." Pharmacol Rev **43**(2): 109-142.
- Morel, F., J. Doussiere, et al. (1991). "The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects." Eur J Biochem **201**(3): 523-546.
- Nauseef, W. M. (2001). "Contributions of myeloperoxidase to proinflammatory events: more than an antimicrobial system." Int J Hematol **74**(2): 125-133.
- Nduka, O. O. and J. E. Parrillo (2009). "The pathophysiology of septic shock." Crit Care Clin **25**(4): 677-702, vii.
- Nichols, B. A. and D. F. Bainton (1973). "Differentiation of human monocytes in bone marrow and blood. Sequential formation of two granule populations." Lab Invest **29**(1): 27-40.
- Noronha-Dutra, A. A., M. M. Epperlein, et al. (1993). "Reaction of nitric oxide with hydrogen peroxide to produce potentially cytotoxic singlet oxygen as a model for nitric oxide-mediated killing." FEBS Lett **321**(1): 59-62.
- Ohmori, M., K. Harada, et al. (2000). "The functions of circulatory polymorphonuclear leukocytes in diabetic patients with and without diabetic triopathy." Life Sci **66**(19): 1861-1870.
- Opal, S. M. and C. T. Esmon (2003). "Bench-to-bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis." Crit Care **7**(1): 23-38.
- Palmer, R. M., A. G. Ferrige, et al. (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." Nature **327**(6122): 524-526.
- Pawloski, J. R., D. T. Hess, et al. (2001). "Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity." Nature **409**(6820): 622-626.
- Pawloski, J. R., D. T. Hess, et al. (2005). "Impaired vasodilation by red blood cells in sickle cell disease." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(7): 2531-2536.
- Peskin, A. V. and C. C. Winterbourn (2001). "Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate." Free Radic Biol Med **30**(5): 572-579.

- Petros, A., D. Bennett, et al. (1991). "Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock." Lancet **338**(8782-8783): 1557-1558.
- Pietraforte, D., P. Matarrese, et al. (2007). "Two different pathways are involved in peroxynitrite-induced senescence and apoptosis of human erythrocytes." Free Radic Biol Med **42**(2): 202-214.
- Pryor, W. A., R. Cueto, et al. (1995). "A practical method for preparing peroxynitrite solutions of low ionic strength and free of hydrogen peroxide." Free Radic Biol Med **18**(1): 75-83.
- Pullar, J. M., C. C. Winterbourn, et al. (1999). "Loss of GSH and thiol enzymes in endothelial cells exposed to sublethal concentrations of hypochlorous acid." Am J Physiol **277**(4 Pt 2): H1505-1512.
- Radi, R., J. S. Beckman, et al. (1991). "Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide." Arch Biochem Biophys **288**(2): 481-487.
- Radomski, M. W., R. M. Palmer, et al. (1987). "Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets." Br J Pharmacol **92**(1): 181-187.
- Radomski, M. W., D. D. Rees, et al. (1992). "S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo." Br J Pharmacol **107**(3): 745-749.
- Rajagopalan, S., X. P. Meng, et al. (1996). "Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability." J Clin Invest **98**(11): 2572-2579.
- Raththagala, M., P. D. Root, et al. (2006). "Dynamic monitoring of glutathione in erythrocytes, without a separation step, in the presence of an oxidant insult." Anal Chem **78**(24): 8556-8560.
- Reeder, B. J., D. A. Svistunenko, et al. (2004). "The radical and redox chemistry of myoglobin and hemoglobin: from in vitro studies to human pathology." Antioxid Redox Signal **6**(6): 954-966.
- Rifkind, J. M., E. Nagababu, et al. (2006). "Nitric oxide redox reactions and red cell biology." Antioxid Redox Signal **8**(7-8): 1193-1203.

- Rifkind, J. M., S. Ramasamy, et al. (2004). "Redox reactions of hemoglobin." Antioxid Redox Signal **6**(3): 657-666.
- Romero, N., A. Denicola, et al. (2006). "Red blood cells in the metabolism of nitric oxide-derived peroxynitrite." IUBMB Life **58**(10): 572-580.
- Romero, N. and R. Radi (2005). "Hemoglobin and red blood cells as tools for studying peroxynitrite biochemistry." Methods Enzymol **396**: 229-245.
- Romero, N., R. Radi, et al. (2003). "Reaction of human hemoglobin with peroxynitrite. Isomerization to nitrate and secondary formation of protein radicals." J Biol Chem **278**(45): 44049-44057.
- Sakr, Y., M. J. Dubois, et al. (2004). "Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock." Crit Care Med **32**(9): 1825-1831.
- Santos, T.M. Micropartículas derivadas de monócitos como potenciais direcionadoras de mieloperoxidase para superfície endotelial. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2009.
- Schultz, J. and K. Kaminker (1962). "Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization." Arch Biochem Biophys **96**: 465-467.
- Segal, A. W. (2008). "The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals." Int J Biochem Cell Biol **40**(4): 604-618.
- Seiki, M. (2002). "The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration." Curr Opin Cell Biol **14**(5): 624-632.
- Shechter, Y., Y. Burstein, et al. (1975). "Selective oxidation of methionine residues in proteins." Biochemistry **14**(20): 4497-4503.
- Shi, L., C. D. Sohaskey, et al. (2005). "Changes in energy metabolism of Mycobacterium tuberculosis in mouse lung and under in vitro conditions affecting aerobic respiration." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(43): 15629-15634.
- Smith, K. J., R. Kapoor, et al. (1999). "Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species." Brain Pathol **9**(1): 69-92.
- Springer, T. A. (1994). "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm." Cell **76**(2): 301-314.

- Springer, T. A. (1995). "Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration." Annu Rev Physiol **57**: 827-872.
- Stamler, J. S., D. I. Simon, et al. (1992). "S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(1): 444-448.
- Stamler, J. S., D. J. Singel, et al. (1992). "Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms." Science **258**(5090): 1898-1902.
- Suthanthiran, M., M. E. Anderson, et al. (1990). "Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(9): 3343-3347.
- Thomas, E. L., M. B. Grisham, et al. (1986). "Preparation and characterization of chloramines." Methods Enzymol **132**: 569-585.
- Trzeciak, S., I. Cinel, et al. (2008). "Resuscitating the microcirculation in sepsis: the central role of nitric oxide, emerging concepts for novel therapies, and challenges for clinical trials." Acad Emerg Med **15**(5): 399-413.
- Trzeciak, S. and E. P. Rivers (2005). "Clinical manifestations of disordered microcirculatory perfusion in severe sepsis." Crit Care **9 Suppl 4**: S20-26.
- Tyurina, Y. Y., L. V. Basova, et al. (2007). "Nitrosative stress inhibits the aminophospholipid translocase resulting in phosphatidylserine externalization and macrophage engulfment: implications for the resolution of inflammation." J Biol Chem **282**(11): 8498-8509.
- Vincent, J. L. and D. De Backer (2005). "Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis." Crit Care **9 Suppl 4**: S9-12.
- Watson, R. W., H. P. Redmond, et al. (1996). "Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of Escherichia coli." J Immunol **156**(10): 3986-3992.
- Weiss, S. J., S. T. Test, et al. (1986). "Brominating oxidants generated by human eosinophils." Science **234**(4773): 200-203.
- Wilkie, R. P., M. C. Vissers, et al. (2007). "A functional NADPH oxidase prevents caspase involvement in the clearance of phagocytic neutrophils." Infect Immun **75**(7): 3256-3263.

- Winterbourn, C. C. (1985). "Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of the oxidant to hypochlorite." Biochim Biophys Acta **840**(2): 204-210.
- Wright, C. D., A. Mulsch, et al. (1989). "Generation of nitric oxide by human neutrophils." Biochem Biophys Res Commun **160**(2): 813-819.
- Wright, C. E., D. D. Rees, et al. (1992). "Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock." Cardiovasc Res **26**(1): 48-57.
- Zhang, B., J. Hirahashi, et al. (2003). "Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis: cross-talk between caspase 8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation." J Biol Chem **278**(31): 28443-28454.
- Zhou, Q., J. Zhao, et al. (2002). "Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase 1." Blood **99**(11): 4030-4038.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - W.H.O. Septic shock. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/index.html>> Acesso em: 15 abr. 2011.