

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Avaliação dos efeitos da frutose-1,6-bisfosfato sobre a agregação plaquetária  
e a coagulação sanguínea na sepse experimental em ratos.

Autora: Luciana Mello de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Dissertação de Mestrado

2007

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Avaliação dos efeitos da frutose-1,6-bisfosfato sobre a agregação plaquetária  
e a coagulação sanguínea na sepse experimental em ratos.

Autora: Luciana Mello de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Dissertação de Mestrado

2007

Oliveira, Luciana Mello de.

Avaliação dos efeitos da frutose-1,6-bisfosfato sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea na sepse experimental em ratos / Luciana Mello de Oliveira; Orientador Rafael Roesler - 2007.

109f. il. col.

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina - Ciências Médicas. Porto Alegre, RS, BR, 2007.

1. Sepse. 2. Frutose-1,6-bisfosfato. 3. Agregação Plaquetária. 4. Coagulação Sanguínea. I. Roesler, Rafael. II. Título.

*“Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco;*

*à medida que adquirimos conhecimentos,*

*instala-se a dúvida.”*

Goethe

*”O importante é nunca deixar de questionar.”*

Einstein

## Agradecimentos:

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino gratuito e de qualidade, que possibilitou a realização de um sonho, em especial ao Prof. Dr. Rafael Roesler pelo auxílio prestado e acolhimento nas horas difíceis. Muito obrigada simplesmente por ter aceitado ser meu orientador!

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, por ter permitido a execução dos experimentos em suas dependências, e a todos os colegas do Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação, pelo auxílio nos momentos difíceis e pelos momentos felizes compartilhados durante e após o trabalho. Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, pelo auxílio prestado durante a execução deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Henrique Bregolin Dias e Robson Heinrich Amaral, que auxiliaram na execução prática deste trabalho.

À estagiária e amiga Alessandra Bileski Magrisso, que mostrou comprometimento, ética e interesse científico no desempenho das suas atividades, e às colegas e amigas Aline Andrea da Cunha, Carolina Maria Alves Bastos e Márcia Keller Alves, pelas conversas, risadas, viagens, jantares e auxílio científico. A presença de vocês foi fundamental nos momentos de dúvida!

À Prof. Dra. Melissa Guerra Simões Pires, que foi amiga, irmã, mãe, orientadora, colega de trabalho e muito mais durante estes últimos anos, e sem a qual este trabalho não teria sido finalizado. Obrigada por tudo!

À Prof. Dra. Flavia Valladão Thiesen, por seu apoio contínuo desde a época da graduação, e por ser uma grande amiga, exemplo profissional e fonte de força e confiança na minha vida acadêmica. Muito obrigada!

Aos amigos Marisa e Marcelo Meruvia, Felipe Comparsi e Giselle Campelo pelo apoio nos momentos difíceis. Mesmo quando distantes, vocês são minha segunda família.

Aos meus pais, Jairo e Nilza, pelo amor e pela confiança. Este trabalho é resultado de um esforço que começou por vocês. Amo vocês.

*Para meus pais.*

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES .....	1
LISTA DE TABELAS E FIGURAS .....	5
RESUMO .....	8
INTRODUÇÃO .....	10
REVISÃO DA LITERATURA .....	12
1. Sepses .....	12
1.1. Definição de sepses.....	12
1.2. Diagnóstico .....	14
1.3. Epidemiologia .....	15
1.3.1. Fisiopatologia: Inflamação, Coagulação e Fibrinólise .....	17
2. Agregação Plaquetária .....	21
2.1. Morfologia e Fisiologia Plaquetária .....	21
2.2. Agregação Plaquetária .....	24
2.2.1. Agregação Plaquetária em Ratos.....	26
2.3. Agregação Plaquetária na Sepses .....	27
3. Coagulação Sangüínea.....	29
3.1. Sistema Pró-Coagulante .....	29
3.2. Mecanismos Anticoagulantes.....	32
3.3. Sistema Fibrinolítico .....	34
3.4. Coagulação na Sepses .....	35
4. Tratamento da Sepses.....	37
5. Frutose-1,6-Bisfosfato.....	38
5.1. Efeitos Fisiológicos: Glicólise e Gliconeogênese.....	38
5.2. Efeitos Terapêuticos .....	40
5.2.1. Coração e Cardiomiócitos .....	40
5.2.2. Eritrócitos .....	43

5.2.3.	Rins .....	43
5.2.4.	Sistema Nervoso Central .....	45
5.2.5.	Fígado .....	46
5.2.6.	Proteção Anti-Radicais Livres (RL).....	47
5.2.7.	Inibição da Agregação Rlaquetária <i>In Vitro</i> .....	49
5.2.8.	Ação Antiinflamatória .....	49
	JUSTIFICATIVA DO TRABALHO .....	51
	REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA .....	52
	OBJETIVOS .....	69
	LOCAL DE EXECUÇÃO.....	70
	ASPECTOS ÉTICOS.....	71
	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	72
	ARTIGO ORIGINAL.....	73
	ANEXOS.....	96
A.	COMPROVANTE DE ENVIO À REVISTA .....	96
B.	NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÕES E TESES .....	97

## LISTA DE ABREVIACOES

ACCP/SCCM - American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine

ADP - Adenosina Difosfato

ALT - Alanina Aminotransferase

AST - Aspartato Aminotransferase

ATIII - Antitrombina III

ATP- Adenosina Trifosfato

BASES - Brazilian Sepsis Epidemiological Study

BPM - Batimentos por Minuto

Ca<sup>++</sup> - Cálcio

CCl<sub>4</sub> - Tetracloreto de Carbono

CIVD - Coagulação Intravascular Disseminada

COX- Cicloxigenase

CPCR - Receptor Endotelial de Proteína C

DMO - Disfuno de Múltiplos rgos

EROs - Espécies Reativas ao Oxignio

FBP - Frutose-1,6-Bisfosfato

FDA - Food and Drug Administration

Fru-6-P - Frutose-6-fosfato

FT - Fator Tecidual

GalN - Galactosamina

Gli-1,6-P2 - Glicose-1,6-Bifosfato

Gli-1-P - Glicose-1-Fosfato

Gli-6-P - Glicose-6-Fosfato

GP - Glicoproteína

IL - Interleucinas

iNOS - Óxido Nítrico-Sintase induzível

IRPM - Movimentos Respiratórios Involuntários por Minuto

K<sup>+</sup> - Potássio

LDH - Lactato Desidrogenase

LPB - Proteína Ligadora do LPS

LPS - Lipopolissacarídeo

Mg<sup>++</sup> - Magnésio

mM - Milimolar

mmHg - Milímetros de Mercúrio

μL - Microlitro

PaCO<sub>2</sub> - Pressão Arterial de Dióxido de Carbono

PAF - Fator Ativador Plaquetário

PAI-1- Inibidor do Ativador do Plasminogênio-1

PC - Proteína C

PCA - Proteína C Ativada

PC-r - Proteína C reativa

PCArh - Proteína C Ativada Recombinante Humana

PF-4 - Fator Plaquetário-4

PGDF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PHA - Fitohemaglutinina

PFK-1 - Fosfofrutoquinase 1

PLC - Fosfolipase C-dependente

PPP - Plasma Pobre em Plaquetas

PROWESS - Protein C World Wide Evaluation in Severe Sepsis

PRP - Plasma Rico em Plaquetas

REL - Retículo Endoplasmático Liso

RL - Radicais Livres

SIRS - Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

TAFI - Inibidor da Fibrinólise Ativado pela Trombina

TEM - Micrografia de Transmissão Eletrônica

TFPI - Fator Inibidor da Via Extrínseca de Coagulação

TM - Trombomodulina

TP - Tempo de Protrombina

t-PA - Ativador do Plasmigênio Tecidual

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral alfa

TTPA: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

TXA<sub>2</sub>- Tromboxano A<sub>2</sub>

TXB<sub>2</sub> - Tromboxano B<sub>2</sub>

u-PA - Ativador do Fibrinogênio tipo Uroquinase

UTIs - Unidades de Terapia Intensiva

VEGF - Fator de Crescimento Vascular Endotelial

Zn<sup>++</sup> - Zinco

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

### REVISÃO DA LITERATURA:

Figura 1: Fisiopatologia da sepse. Infecção, inflamação e coagulação atuam simultaneamente, levando à trombose na microcirculação e disfunção de múltiplos órgãos (DMO). A DMO também retro-alimenta o sistema, ampliando a resposta inflamatória e ativando a cascata de coagulação.

Figura 2: Ativação do monócito pelo LPS.

Figura 3: Micrografia de transmissão eletrônica (TEM) de uma plaqueta em repouso seccionada, exibindo as organelas.

Figura 4: Representação clássica da cascata de coagulação.

### ARTIGO:

Figure 1: *In vitro* platelet aggregation in high rats and the inhibitory effects of increasingly higher doses of fructose-1,6-bisphosphate (FBP). Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical differences are represented as: \*  $P < 0.05$ ,

compared to control group; \*\*  $P < 0.001$ , compared to control group; ●  $P < 0.007$ , compared to FBP 2.5mM group; ●●  $P < 0.001$ , compared to FBP 5.0 mM group; □  $P < 0.001$ , compared to FBP 10mM group; □□  $P < 0.05$ , compared to FBP 20 mM group.

Figure 2: *In vitro* platelet aggregation in septic rats and the effects of increasingly higher doses of fructose-1,6-bisphosphate (FBP). Data are expressed as mean and standard deviation. Statistical differences are represented as: \*  $P < 0.001$ , compared to other groups; \*\*  $P < 0.001$ , compared to FBP 2.5mM, 5mM and 10mM; ●  $P < 0.001$ , compared to FBP 20mM group.

Figure 3: Platelet aggregation in rats twelve hours after the administration of fructose-1,6-bisphosphate (FBP), 2g/kg. Data are expressed as mean and standard deviation. Statistical differences are represented as: \*  $P < 0.05$ , compared to higid group; \*\*  $P < 0.001$ , compared to higid and septic group.

Figure 4: Platelet number in rats and the effects of the administration of fructose-1,6-bisphosphate (FBP), 2g/kg. Data are expressed as mean and standard deviation. Statistical difference is represented as: \*  $P < 0.001$ , compared to higid and FBP group.

Figure 5: Prothrombin time (PT) in rats and the effects of the administration of fructose-1,6-bisphosphate (FBP), 2g/kg . Data are expressed as mean and standard deviation. Statistical difference is represented as: \*  $P < 0.001$ , compared to higid and FBP group.

Figure 6: Activated partial thromboplastin time (APTT) in rats and the effects of the administration of fructose-1,6-bisphosphate (FBP), 2g/kg. Data are expressed as mean and standard deviation. Statistical difference is represented as: \*  $P < 0.001$ , compared to higid and FBP group.

Figure 7: Fibrinogen levels in rats and the effects of the administration of fructose-1,6-bisphosphate (FBP), 2g/kg. Data are expressed as mean and standard deviation. Statistical differences are represented as: \*  $P < 0.001$ , compared to higid group.

## RESUMO

A sepse é uma das principais causas de admissão de pacientes nas unidades de terapia intensiva e apresenta altas taxas de mortalidade. Anormalidades na coagulação são freqüentes em pacientes com sepse e contribuem para o desenvolvimento da disfunção de múltiplos órgãos. A Frutose-1,6-bisfosfato (FBP) é uma substância formada na rota glicolítica que tem demonstrado efeito terapêutico em diversas situações que envolvem lesão celular, como, por exemplo, a sepse. Além de diminuir a resposta inflamatória, a FBP também pode inibir a agregação plaquetária *in vitro* induzida por diversos agregantes. Este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos *in vitro* da FBP sobre a agregação plaquetária em plasma de ratos hígidos e sépticos, bem como os efeitos do tratamento com FBP no momento da indução da sepse sobre a agregação plaquetária e coagulação sangüínea. Em um primeiro momento foram conduzidos os experimentos *in vitro*. Os animais foram divididos em dois grupos, hígido e séptico, e doses crescentes de FBP foram incubadas no plasma destes animais. Em um segundo experimento, os animais foram divididos em três grupos experimentais: controle, séptico e séptico tratado com FBP 2g/kg. Doze horas após a indução da sepse, o sangue dos animais foi coletado para as avaliações referentes à coagulação sangüínea e a agregação plaquetária *ex-vivo*. A FBP inibiu a agregação plaquetária *in vitro* ( $p < 0,001$ ) de maneira dose-dependente. Em ratos hígidos, a inibição foi verificada a partir da dose mais baixa testada, 2,5mM. A dose média efetiva calculada foi de 10,6mM. A dose mais alta testada no grupo hígido, 40mM, inibiu completamente a agregação plaquetária. Já a agregação plaquetária em plasma obtido de ratos sépticos foi inibida somente com doses mais altas de FBP, a partir de 20mM. A dose média efetiva calculada foi de 19,3mM. A agregação plaquetária *ex vivo* foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) em

ratos sépticos e sépticos tratados com FBP 2g/kg. A agregação plaquetária no grupo tratado foi de 27%, significativamente menor que no grupo séptico, e preveniu a trombocitopenia ( $p < 0,001$ ). Além disso, o tratamento com FBP reverteu o prolongamento dos tempos de protrombina ( $p < 0,001$ ) e tromboplastina parcial ativada ( $p < 0,001$ ), resultados que sugerem que a FBP possui um efeito inibidor da agregação plaquetária e coagulação sanguínea *in vivo*, representando um possível tratamento para a coagulação intravascular disseminada decorrente da sepse. Entretanto, outros estudos são necessários para avaliação deste efeito. Os mecanismos de ação ainda estão sob investigação.

*Palavras-chave:* sepse, inflamação, agregação plaquetária, coagulação sanguínea, frutose-1,6-bisfosfato, ratos.

## INTRODUÇÃO

A sepse, o choque séptico e a disfunção de múltiplos órgãos (DMO) são as principais causas de mortalidade nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). A sepse é uma síndrome clínica decorrente de infecção grave, associada à inflamação sistêmica e lesão tecidual, que apresenta altas taxas de mortalidade e custo de tratamento (1-6). No Brasil, cerca de 25% dos pacientes internados em terapia intensiva apresentam sepse grave desde a internação ou a desenvolvem durante sua permanência na unidade (5, 7).

Os conceitos sobre a fisiopatologia da sepse estão mudando. Atualmente considera-se que a inflamação, a coagulação e a fibrinólise atuam simultaneamente no processo evolutivo da doença. Na sepse há um desequilíbrio entre a via pró-coagulante e os mecanismos anticoagulantes, e estes eventos compõem um dos principais fatores da disfunção orgânica. O sistema de coagulação e as plaquetas são ativados nos estágios iniciais da doença, ocasionando coagulopatia e trombocitopenia. Esse processo pode progredir, levando a coagulação intravascular disseminada (CIVD), que pode apresentar-se como trombose na microcirculação e sangramentos. Apesar das manifestações hemorrágicas receberem bastante atenção, a trombose microvascular é considerada patologicamente mais importante, pois está fortemente ligada ao desenvolvimento da DMO (5, 8-17).

Em novembro de 2001, uma forma recombinante da proteína C ativada (PCArh) foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de pacientes com sepse severa. O estudo randomizado denominado PROWESS (Protein C World Wide Evaluation in Severe Sepsis) avaliou a utilidade do fármaco contra a sepse e revelou uma redução de 6,1% do risco absoluto de morte. Uma análise detalhada revelou que apenas

pacientes de alto risco apresentam redução significativa na mortalidade (44% de mortalidade no grupo de pacientes que receberam placebo contra 31% no grupo que recebeu PCArh) (18-23). Os mecanismos pelos quais a PCArh aumenta a sobrevida em humanos ainda não estão completamente elucidados (18), mas sua introdução na terapêutica estimulou a pesquisa de uma série de estratégias farmacológicas no tratamento da sepse (24-30). Este estudo teve por objetivo investigar os efeitos do uso da frutose-1,6-bisfosfato (FBP) sobre a agregação plaquetária e coagulação sanguínea na sepse experimental em ratos.

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1. Sepsis

#### 1.1. Definição de sepsis

A sepsis é uma síndrome clínica, decorrente de infecção grave, associada à inflamação sistêmica e lesão tecidual. O nome síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS, do inglês *systemic inflammatory response syndrome*) designa uma lesão tecidual difusa, provocada por um insulto não-infeccioso (pancreatite aguda ou grande queimado, por exemplo), que é secundária à perda da regulação da resposta inflamatória do indivíduo. Quando a SIRS é decorrente de uma infecção confirmada ou suspeita, chamamos de sepsis (6). Pode-se definir sepsis, portanto, como uma resposta inflamatória sistêmica secundária a um processo infeccioso (31).

Diferente de outras doenças, a sepsis pode representar distintas situações clínicas dentro de um mesmo espectro evolutivo: o mesmo paciente pode, ao longo de sua internação, evoluir para diferentes estágios da patologia, como sepsis ou choque séptico. Assim, faz-se necessária adequada utilização dos termos que definem sepsis (5). Para tanto, em 1991, durante a conferência do American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM) foi realizado o Consenso de Sepsis, com o objetivo de padronizar os termos sobre sepsis. Foram estabelecidas as seguintes definições, até hoje utilizadas (31):

- Infecção: presença de microorganismo ou à invasão de tecido normalmente estéril àqueles organismos.
- Bacteremia: presença de bactérias viáveis no sangue.
- Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS): resposta do organismo a um insulto variado (trauma, pancreatite, grande queimado, infecção sistêmica), com a presença de pelo menos dois dos critérios abaixo:
  - Febre, temperatura corporal acima de 38°C ou Hipotermia, temperatura corporal abaixo de 36°C;
  - Taquicardia - frequência cardíaca acima 90 bpm;
  - Taquipnéia - frequência respiratória maior que 20 irpm ou  $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg;
  - Leucocitose ou leucopenia - leucócitos mais de 12.000 células/ $\text{m}^3$  ou menos de 4.000 células/ $\text{mm}^3$ , ou presença de mais de 10% de formas jovens (bastões).
- Sepses: quando a SIRS é decorrente de um processo infeccioso comprovado.
- Sepses graves: sepses associadas a manifestações de hipoperfusão tecidual e disfunção orgânica, caracterizada por acidose láctica, oligúria ou alteração do nível de consciência, ou hipotensão arterial com pressão sistólica menor do que 90 mmHg - porém, sem a necessidade de agentes vasopressores.
- Choque séptico: quando a hipotensão ou hipoperfusão induzido pela sepsis é refratária à ressuscitação volêmica adequada e com subsequente necessidade de administração de agentes vasopressores.

- **Hipotensão:** pressão arterial sistólica menor que 90mmHg ou redução de 40mmHg da linha de base, na ausência de outras causas de hipotensão.
- **Disfunção de múltiplos órgãos:** alteração na função orgânica de forma que a homeostasia não pode ser mantida sem intervenção terapêutica. É um processo contínuo e dinâmico, podendo variar desde disfunção leve até falência total do órgão. Geralmente são utilizados parâmetros de seis sistemas-chave: pulmonar, cardiovascular, renal, hepático, neurológico e coagulação.

## 1.2. Diagnóstico

As definições ACCP/SCCM podem dar a idéia de que existe uma evolução linear dos estágios da sepse no quadro clínico do paciente, iniciando em SIRS e aumentando em gravidade até o choque séptico. Na clínica, isso nem sempre ocorre. O quadro clínico clássico de febre, leucocitose, taquicardia e taquipnéia pode não ser observado em todos os casos. Além disso, febre moderada pode estar presente em outros tipos de choque, mas não no choque séptico. (5, 6). No entanto, uma série de características clínicas e laboratoriais, em uma variedade de órgãos e tecidos, são frequentemente encontradas na sepse e contribuem para o diagnóstico (6):

- **Alterações Sistêmicas:** febre ou hipotermia, calafrios, taquipnéia;

- **Marcadores Inflamatórios:** alteração na leucometria, aumento de procalcitonina e da proteína C-reativa (PC-r);
- **Alterações da Coagulação:** aumento de D-dímeros, prolongamento do tempo de protrombina (TP) e tromboplastina parcial ativada (APTT);
- **Alterações Hemodinâmicas:** taquicardia, hipotensão, aumento do débito cardíaco, resistência vascular sistêmica baixa, baixa taxa de extração do oxigênio;
- **Alterações Metabólicas:** redução da perfusão da pele, oligúria, hiperlactatemia, enchimento capilar lentificado;
- **Disfunções Orgânicas:** aumento de uréia e creatinina, trombocitopenia e outras alterações da coagulação, hiperbilirrubenia, alterações do estado mental, hipoxemia, íleo paralítico.

### 1.3. Epidemiologia

A maioria dos estudos epidemiológicos em sepse utiliza dados de incidência em diferentes ambientes, como enfermarias e unidades de terapia intensiva. Esses estudos apontam basicamente para a taxa de ocorrência da sepse nessas áreas; entretanto, a real incidência da sepse deve ser calculada a partir de dados populacionais (5). Angus e colaboradores realizaram, em 1992, o único estudo com base populacional revelando a incidência de sepse grave. Este estudo retrospectivo revelou que a sepse, o choque séptico e a disfunção de múltiplos órgãos (DMO) são as principais causas de mortalidade

nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). A taxa de mortalidade pode variar de 28 a 80%, dependendo de fatores que incluem a severidade da sepse, o número de órgãos em falência, a idade, as co-morbidades e o tempo de internação. De 750.000 pacientes acometidos de sepse, 215.000 evoluíram ao óbito, perfazendo uma taxa de 29% de mortalidade (1). Pesquisas apontam que a incidência da sepse aumenta de 1,5 e 8% ao ano, apesar dos desenvolvimentos técnicos em UTIs e dos avançados tratamentos de suporte. O custo de internação de pacientes sépticos é muito alto, pois estes permanecem hospitalizados geralmente por períodos extensos, raramente deixando a UTI antes de 2-3 semanas (18).

Pesquisas recentes apontam que a incidência da sepse está aumentando em 1,5 e 8% ao ano, apesar dos desenvolvimentos técnicos em unidades de terapia intensiva e dos avançados tratamentos de suporte (1, 5, 7, 18, 32). Assumindo um crescimento anual de casos por ano de 1,5% , como referido por Angus e colaboradores, chegaríamos a 934.000 novos casos em 2010 e 1.110.000 casos no ano de 2020, somente nos Estados Unidos (1). O custo de internação de pacientes sépticos é muito alto, pois estes permanecem hospitalizados geralmente por períodos extensos, raramente deixando a UTI antes de 2-3 semanas (1, 5, 7, 18, 32). Cada paciente despende 22.000 dólares para o tratamento, sendo que os não sobreviventes despendem maiores recursos, em torno de 26.000 dólares. Pacientes internados em unidades de terapia intensiva alcançavam valores ainda superiores, cerca de 30.000 dólares (1).

No Brasil, os dados epidemiológicos são escassos; porém, desde 2002, vem sendo desenvolvido o estudo denominado BASES (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*). Em 2004, dados preliminares deste estudo de coorte foram publicados. Este estudo avaliou todos os pacientes admitidos em cinco UTIs no país, independente da sua patologia de base, que foram avaliados durante todo o período de internação na UTI.

Dados clínicos e laboratoriais foram coletados diariamente no sentido de verificar a presença de SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico. Dois grupos foram prospectivamente formados: a) pacientes que permanecem menos de 24 horas na UTI e b) aqueles que permanecem mais de 24 horas. Nos pacientes com mais de 24 horas, a incidência de sepse grave e de choque séptico foi de 27% e 23%, respectivamente. Em geral, a morte do paciente séptico está mais relacionada com o evento infeccioso do que com a doença de base, quando essa ocorre no período hospitalar. Estes resultados levam a crer que a sepse é um dos principais problemas de saúde pública nas UTIs brasileiras, onde cerca de 25% dos pacientes internados em terapia intensiva manifestam um quadro compatível com sepse grave desde a internação ou desenvolverão o mesmo durante sua permanência na unidade. A densidade da incidência de sepse é de 57 para 1000 pacientes/dia, apresentando diferenças importantes entre instituições públicas e privadas (7). A expansão desses dados para outras regiões do país é de fundamental importância para se estimar a real incidência de sepse e sua mortalidade atribuída nas UTIs brasileiras; para tanto, hoje o estudo BASES envolve sete UTIs.

### 1.3.1. Fisiopatologia: Inflamação, Coagulação e Fibrinólise

Os paradigmas da fisiopatologia da sepse estão mudando. Um dos novos conceitos que têm modificado a visão da sepse é o impacto da inflamação, coagulação e fibrinólise atuando simultaneamente no processo evolutivo da doença (Figura 1), uma vez que, anteriormente a atenção era voltada somente para a inflamação como

processo dominante nos eventos desencadeados pela sepse que levavam a DMO (5, 17, 33-36).

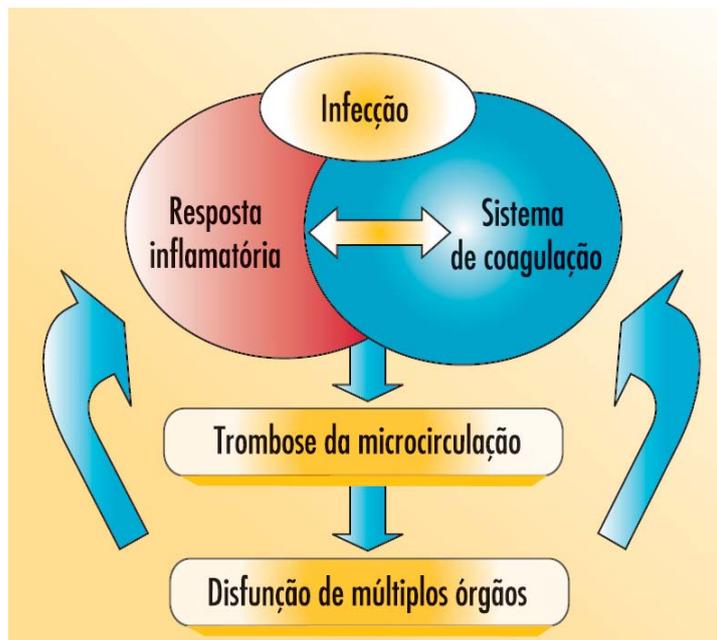


Figura 1: Fisiopatologia da sepse. Infecção, inflamação e coagulação atuam simultaneamente, levando à trombose na microcirculação e disfunção de múltiplos órgãos (DMO). A DMO também retro-alimenta o sistema, ampliando a resposta inflamatória e ativando a cascata de coagulação. Fonte: Consenso Brasileiro de Sepse (5).

A inflamação é a resposta orgânica normal a uma infecção. Ao se considerar uma infecção por gram-negativos, a resposta inflamatória se inicia após a interação do LPS com a proteína ligadora do LPS (*LBP*, do inglês *LPS binding protein*). Este complexo liga-se ao receptor de membrana do monócito/macrófago denominado CD14, que não possui porção intracelular, tornando impossível a ativação celular. Com a descoberta dos

receptores *Toll-like*, pôde-se entender como o complexo LPS-LBP-CD14 ativa a célula. Este receptor *Toll-like* ativa uma série de eventos intracelulares que culmina com a ativação do NF $\kappa$ B e, por conseqüência, ativação de genes relacionados à produção de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- $\alpha$  (Fator de necrose tumoral alfa), as interleucinas 1 e 6 (IL-1, IL-6) e o fator ativador plaquetário (PAF) (Figura 2). Esses mediadores apresentam múltiplos efeitos a fim de reparar danos já existentes e prevenir novas lesões teciduais. Para assegurar que os efeitos dos mediadores pró-inflamatórios não se tornem destrutivos, o organismo libera mediadores anti-inflamatórios, como as interleucinas 4 e 10 (IL-4, IL-10), que normalmente promovem um processo de *downregulation* sobre a resposta pró-inflamatória inicial. O papel da IL-10 é realmente importante uma vez que dados recentes demonstram que camundongos sépticos, geneticamente incapazes de gerar IL-10, apresentam letalidade maior que os controles. Na sepse, esse controle da resposta inicial à infecção é superado, ocorrendo uma reação sistêmica exacerbada e extremamente danosa. O excesso dos mediadores inflamatórios, TNF- $\alpha$  e IL-1, provoca uma resposta fisiológica inadequada e interfere na função normal tecidual, levando ao dano celular e à DMOs (32, 33, 37, 38).

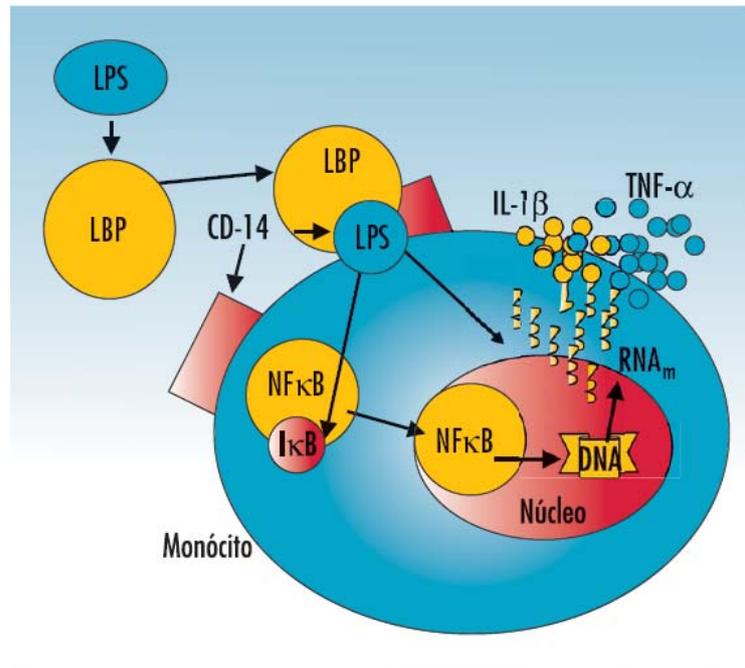


Figura 2: Ativação de monócito pelo LPS. Fonte: Consenso Brasileiro de Sepse (5).

Junto à ativação do sistema inflamatório, o sistema de coagulação é recrutado e as plaquetas são ativadas. Durante a sepse há um desequilíbrio entre a via pró-coagulante e os mecanismos anticoagulantes e, isso faz parte dos principais fatores da disfunção orgânica na sepse (39).

## 2. Agregação Plaquetária

Plaquetas, ou trombócitos, são derivadas do citoplasma de megacariócitos presentes na medula óssea. São células pequenas, anucleadas e discóides, com um diâmetro de 2 a 4  $\mu\text{m}$ , com vida média de 9 a 12 dias. A contagem normal de plaquetas é de 130 a 400  $\times 10^3/\mu\text{L}$ , dependendo da metodologia empregada. A função plaquetária normal, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, requer uma contagem de ao menos 100  $\times 10^3/\mu\text{L}$  (44-47).

### 2.1. Morfologia e Fisiologia Plaquetária

A estrutura das plaquetas é bastante distinta, levando a uma subdivisão em três zonas definidas que possuem capacidades funcionais únicas (44, 45):

#### I- Zona periférica

Região complexa que consiste do glicocálix, membrana plaquetária, numerosos canais de superfície que compõem o sistema canicular aberto, e uma área submembranosa de microfilamentos especializados (44, 45).

O glicocálix cobre intimamente a plaqueta e é considerado um componente importante da membrana plaquetária. Um número de glicoproteínas (GP) presentes nesta área é responsável pela especificidade de grupo sanguíneo, compatibilidade

tissular e antigenicidade plaquetária; outras servem como receptores e facilitam a transmissão de estímulos através da membrana plaquetária. A GP Ib é o receptor primário para o fator de von Willebrand, que funciona como um mediador para a adesão inicial das plaquetas ao subendotélio. A GP de membrana GP IIb/IIIa funciona como um receptor para substâncias, tais como o fibrinogênio, fibronectina e fator de von Willebrand, e possui, portanto, função mediadora da agregação plaquetária. Cálcio e/ou magnésio na forma de cátions divalentes também são necessários para a ligação com o fibrinogênio (44, 45).

A membrana plaquetária, similar a outras membranas plasmáticas, é um fluido lipídico bicamada, composta de glicoproteínas, glicolípídeos e lipoproteínas. A porção fosfolipídica da plaqueta ativada serve de superfície para a interação das proteínas plasmáticas envolvidas na coagulação sanguínea. Os fatores de coagulação V e VIII também estão presentes na superfície da membrana plaquetária, como vários fatores plaquetários que participam da formação da fibrina (44, 45).

O sistema canicular aberto consiste de invaginações da membrana plasmática que se articulam através da plaqueta, embora seja parte da zona periférica. Os produtos armazenados nas plaquetas são liberados para o exterior através dessas invaginações, que também coleta substâncias pró-coagulantes do plasma (44, 45).

## II- Zona Solugel

A zona solugel é formada por microtúbulos e microfilamentos. Microtúbulos envolvem as plaquetas, mantendo o formato discóide. Na plaqueta estimulada, contrações na banda circunferencial dos microtúbulos em direção ao centro da plaqueta são responsáveis pela movimentação das organelas para o interior da plaqueta e sua

reorganização, o que facilita o processo secretório. Após a secreção, os microtúbulos migram do centro da plaqueta para áreas periféricas, na forma de pseudópodos. Além disso, monitoram as contrações internas das plaquetas, regulando o grau de resposta aos estímulos. Microfilamentos formam um tecido através do citoplasma da plaqueta e são formados por actina e miosina. Actina é a principal proteína contrátil do citosol, correspondendo a 20-30% das proteínas totais, enquanto a miosina compõe de 2 a 5% das proteínas totais das plaquetas. Também apresentam trombostenina, outra proteína de função contrátil. Microfilamentos podem convergir de um estado gelatinoso desorganizado para filamentos paralelos organizados capazes de contrair em segundos enquanto a plaqueta é estimulada (44, 45).

### III- Zona das Organelas

Responsável pelas atividades metabólicas das plaquetas. De modo geral, as organelas mais numerosas são os grânulos, que são heterogêneos em tamanho, densidade eletrônica e conteúdo químico. As plaquetas contêm três tipos de grânulos de estocagem morfológicamente distintos: grânulos densos, alfa grânulos e lisossomos contendo hidrolases ácidas. Os alfa-grânulos são os mais numerosos (20 a 200 por plaqueta) e contêm uma série de proteínas envolvidas na agregação plaquetária, como FAP, PGDF e fatores de coagulação. Grânulos densos são encontrados em menor número (2 a 10 por plaqueta) e são representados como corpos opacos em micrografias de transmissão eletrônica (TEM) (Figura 3). Contém, entre outras substâncias, adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), cálcio ( $Ca^{++}$ ), magnésio ( $Mg^{++}$ ), catecolaminas como epinefrina e norepinefrina, serotonina, pirofosfato (44, 45).

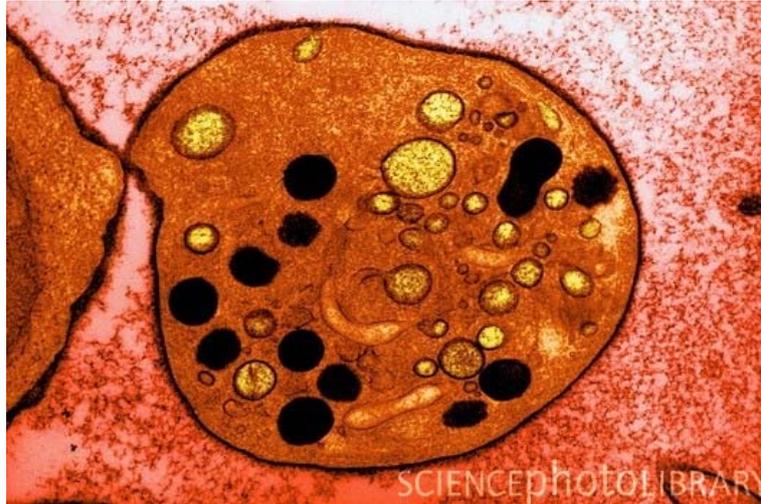


Figura 3: Micrografia de transmissão eletrônica (TEM) de uma plaqueta em repouso seccionada, exibindo as organelas. Fonte: Science Photo Library (48).

O sistema tubular denso é outra estrutura importante presente no citoplasma, formada a partir do retículo endoplasmático liso (REL) de megacariócitos imaturos. É o local de síntese de prostaglandinas e tromboxano e de seqüestro de cálcio; é a liberação primária de cálcio do sistema tubular denso que engatilha a contração plaquetária e a subsequente ativação interna das plaquetas (44, 45).

## 2.2. Agregação Plaquetária

Numerosos estímulos podem iniciar a agregação plaquetária, que pode ser transitória, reversível ou irreversível. As plaquetas respondem de diferentes formas, dependendo da força e duração do estímulo, bem como das funções fisiológicas e do estado patológico das plaquetas. No estágio inicial de ativação, as plaquetas formam pseudópodos enquanto começam a contrair; se o estímulo persiste, a contração e formação dos pseudópodos aumentam. Organelas, como grânulos densos e alfa grânulos

são reorganizados para o centro das plaquetas, e a contração faz com que estas secretem seus conteúdos através do sistema de canalículos abertos para o meio extracelular. As plaquetas adjacentes são ativadas através de receptores em contato com os grânulos densos, amplificando a ativação (44-47).

Quando há dano vascular, as plaquetas são incorporadas na parede do vaso, liberando fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), mantendo assim a integridade do vaso e nutrindo as células vasculares ao redor da lesão. A exposição ao tecido conectivo subendotelial, como às fibras de colágeno, iniciam a adesão plaquetária, um processo reversível, de baixo consumo de energia, que envolve a interação das glicoproteínas de superfície das plaquetas com elementos do tecido conectivo do subendotélio. A secreção é um processo com consumo de energia que envolve a liberação de ADP, serotonina e  $Ca^{++}$  das organelas. (44, 45, 47).

Em 1956 foi demonstrado que as plaquetas contêm ATP em concentrações extraordinariamente altas, e que este ATP se quebra rapidamente quando as plaquetas estão suspensas em plasma em coagulação. Também foi sugerido que, se esta quebra de ATP ocorre na superfície das plaquetas, a tendência de agregar-se das plaquetas é aumentada. Mais tarde foi descoberto que as plaquetas também aderem umas às outras no plasma e também a outras superfícies pela adição de ADP (44-47, 49). A especificidade do ADP em agregar plaquetas sugere que este efeito seja significativo fisiologicamente tanto na ligação deste aos receptores específicos de membrana  $P_2Y$  (50), iniciando o estímulo, quanto de sua liberação dos grânulos das plaquetas, ampliando a intensidade do estímulo. A ligação do ADP na membrana plaquetária ativa a fosfolipase, que cliva os fosfolípidios presentes na membrana plaquetária, liberando ácidos graxos como o ácido araquidônico. Por sua vez, o ácido araquidônico é convertido no citoplasma das plaquetas em endoperóxidos pelas enzimas cicloxigenase

(COX) I e II. Os endoperóxidos são convertidos a  $\text{TxA}_2$ , importante agregante de plaquetas, mediador da fase de secreção e promotor da vasoconstrição. A ação do  $\text{TXA}_2$  é limitada por sua meia-vida de 30 segundos, quando é hidrolisado a tromboxano  $\text{B}_2$  ( $\text{TXB}_2$ ) (44-47, 49).

Cálcio ionizado e fibrinogênio plasmático são fundamentais para a agregação plaquetária. O fibrinogênio se liga a complexos de cátions divalentes ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ) das glicoproteínas de membrana (GPIIb/IIIa); uma vez ligado a estes complexos, forma pontes entre cálcio extracelular ionizado dependente de fibrinogênio com as plaquetas adjacentes, promovendo, portanto agregação plaquetária. Outros agonistas da agregação também têm um papel importante, tanto na estimulação plaquetária quanto na exposição do sítio de ligação do fibrinogênio. (44, 45, 47).

A agregação plaquetária *in vitro* pode ser iniciada por uma grande variedade de agentes: ADP, colágeno, epinefrina, trombina, ristocetina, serotonina, ácido araquidônico, peçonhas, agentes imunizantes. A eficiência deste fenômeno está associada ao agonista e sua concentração utilizada para a resposta *in vitro* (49, 51). A agregação *in vitro*, da mesma maneira que a agregação *in vivo*, é um processo bifásico que pode ser reversível ou irreversível, dependendo da potência do estímulo. (44-47).

### 2.2.1. Agregação Plaquetária em Ratos

Ratos e plaquetas de ratos são muito utilizados em modelos de trombose e hemostase; no entanto, a resposta *in vitro* de plaquetas de ratos pode ser influenciada por uma série de fatores, tais como a variação de animal utilizado (52, 53), o gênero

(54), o antiagregante empregado (53, 55-57) e agente anestésico empregado na coleta (53, 55) o agente agregante utilizado (53, 57) e o modo de coleta (58).

Há quase três décadas é documentado que plaquetas humanas agregam em resposta à epinefrina, e que este efeito é devido à ligação da mesma em receptores  $\alpha$ -adrenérgicos específicos (59). Embora existam receptores  $\alpha$ -adrenérgicos na superfície das plaquetas em ratos, a epinefrina exerce pobre ação agregante como agente isolado, não causando ativação ou agregação plaquetária, sendo inclusive um inibidor da agregação plaquetária induzida por trombina (60, 61).

As plaquetas de ratos são também resistentes aos colágenos obtidos de tecido conectivo oriundos de ratos, humanos e bovinos (57) e não respondem à ação do PAF por não possuírem receptores específicos para o mesmo. O ADP é considerado o agente agregante de melhor resposta; no entanto, plaquetas de ratos não respondem ao ADP quando o agente agregante empregado é o citrato de sódio, sendo preferível o uso da heparina (53, 55). Da mesma maneira, a agregação plaquetária induzida por ADP é influenciada pelo anestésico empregado; o éter e o metoxiflurano são os agentes anestésicos mais indicados (55).

### 2.3. Agregação Plaquetária na Sepsis

A agregação plaquetária pode ser vista como uma sucessão de eventos envolvendo ativação, adesão, agregação, secreção e promoção de atividade coagulante. Através da adesão e da agregação ao subendotélio, as plaquetas mantêm a hemostase primária, ocluindo locais de dano vascular e permitindo a reunião dos fatores de

coagulação responsáveis pela formação de trombo (62). A sepse severa, o choque séptico e a endotoxemia estão associados com efeitos significativos na coagulação, sistema fibrinolítico e agregação plaquetária, e as alterações no balanço dos mecanismos de hemostasia impulsionam a progressão destes estados patológicos (63). Anormalidades na coagulação e trombocitopenia são comuns na sepse severa, e podem variar de diminuições de menor importância na contagem de plaquetas e alterações nos testes de coagulação até CIVD e trombose microvascular generalizada, e a severidade das desordens na hemóstase parecem se correlacionar com a severidade da doença (3, 8-18, 33-36, 46, 62, 64-82).

Enquanto poucos autores afirmam que haja um aumento na agregação plaquetária *in vitro* na sepse (65, 83, 84), mas a maioria dos estudos relatam que há um decréscimo na agregação plaquetária e na contagem de plaquetas na sepse, independentemente do agente agregante utilizado; a trombocitopenia constitui um mau prognóstico. A agregação plaquetária está comprometida tanto em pacientes com CIVD quanto em pacientes que não apresentam o quadro (17, 46, 62, 64, 65, 77, 82, 85, 86)

Os  $\alpha$ -grânulos plaquetários contêm fatores de crescimento vascular, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), PDGF e fator plaquetário-4 (PF-4), que são liberados durante a agregação. O VEGF é um potente fator angiogênico, que regula a proliferação, diferenciação e sobrevivência do endotélio microvascular; o PDGF contribui também para angiogênese e reparo endotelial, mas pouco é sabido sobre o seu papel na resposta à sepse. A liberação de VEGF é significativamente superior em pacientes sépticos, quando comparados a controles sadios (62). As citocinas (IL-1B, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ), em contraste com os agonistas clássicos, não ativam plaquetas (63).

### 3. Coagulação Sangüínea

A formação do coágulo de fibrina no sítio de lesão endotelial constitui processo crucial para a manutenção da integridade vascular. Os mecanismos operantes nesse processo são dependentes da integridade anatômica e funcional do sistema hemostático, e devem ser finamente regulados de modo a evitar perda excessiva de sangue e a formação de trombos intravasculares decorrentes de formação excessiva de fibrina. Os componentes do sistema hemostático incluem as plaquetas, os vasos, as proteínas da coagulação do sangue, os anticoagulantes naturais e o sistema de fibrinólise. O equilíbrio funcional desses fatores é garantido por uma variedade de mecanismos envolvendo interações entre proteínas, respostas celulares complexas, e regulação de fluxo sangüíneo (87-89).

#### 3.1. Sistema Pró-Coagulante

A formação do coágulo de fibrina envolve complexas interações entre proteases plasmáticas e seus cofatores, que culminam na gênese da trombina, que por proteólise converte o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel (88-91). Em 1964, MacFarlane propôs a hipótese da “cascata” (Figura 4) para explicar a fisiologia da coagulação do sangue (92). Nesse modelo, a coagulação ocorre por meio de ativação proteolítica seqüencial de zimógenos por proteases plasmáticas, resultando na formação de trombina, que então converte o fibrinogênio em fibrina. A coagulação se dividiria em uma via extrínseca e uma via intrínseca, que convergem no ponto de ativação do fator X

(“via final comum”). Na via extrínseca, o fator VII plasmático ativa diretamente o fator X. Na via intrínseca, ativação do fator XII ocorre por contato e requer ainda a presença de pré-caliceína e cininogênio de alto peso molecular. O fator XIIa ativa o fator XI, que por sua vez ativa o fator IX. O fator IXa, na presença de fator VIII, ativa o fator X da coagulação, desencadeando a geração de trombina e subsequente formação de fibrina (87, 92, 93).

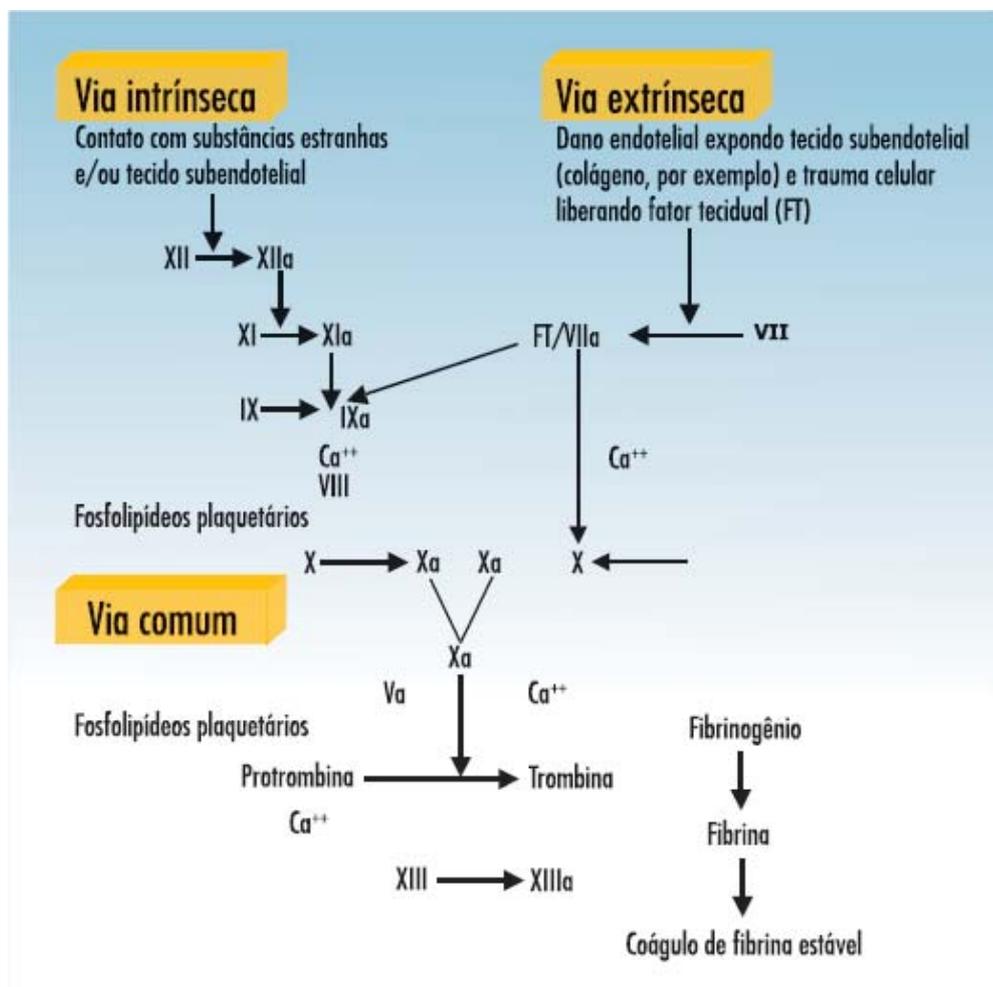


Figura 4: Representação clássica da cascata de coagulação. Fonte: Consenso Brasileiro de Sepse(5)

Embora haja a tradição de se dividir o sistema de coagulação do sangue em intrínseco e extrínseco, tal separação é atualmente entendida como inadequada para entendimento da fisiologia da coagulação. A análise do conjunto de reações envolvidas na coagulação do sangue mostra que não há distinção clara entre os sistemas intrínseco e extrínseco, que atuam de modo altamente interativo *in vivo*. No entanto, a utilização dos termos “intrínseco” e “extrínseco” é útil para fins didáticos e na interpretação de exames laboratoriais utilizados na rotina da avaliação da hemostasia: o TP e o TTPA, que são de particular importância na monitorização de terapêutica anticoagulante. Na execução desses testes *in vitro*, criam-se no tubo de reação as condições para ativação preferencial das vias ditas extrínseca (avaliada pelo TP) ou intrínseca (avaliada pelo TTPA) (53).

O início do processo de coagulação depende da ocorrência de dano vascular ou alterações bioquímicas (por exemplo, liberação de citocinas). Qualquer que seja o evento desencadeante, o início da coagulação do sangue é dependente da expressão do seu componente crítico, o fator tecidual (FT), por células endoteliais e pelo monócito, e sua exposição ao espaço intravascular. O FT é uma glicoproteína de membrana de 45000 Da que funciona como receptor para o fator VII da coagulação, e apresenta expressão constitutiva em fibroblastos subjacentes ao endotélio vascular. Células endoteliais e monócitos, que normalmente não expressam o fator tecidual, podem expressá-lo na ocorrência de lesão endotelial e na presença de estímulos específicos tais como endotoxinas e citocinas (87, 94-99).

Em indivíduos normais, níveis mínimos da forma ativada do fator VII da coagulação (FVIIa) estão presentes em circulação. O FVIIa é capaz de se ligar ao FT expresso em membranas celulares, formando um complexo que exibe função enzimática ativa, também capaz de ativar o próprio FVII em um processo denominado “auto-

ativação”. O complexo FT-FVIIa tem como substratos principais o fator IX e o fator X, cuja clivagem resulta na formação de FIXa e FXa, respectivamente, com subsequente formação de trombina e fibrina. Uma vez que há formação de trombina, o complexo FT-FVIIa é capaz de ativar o fator V e o fator VIII. Essas duas reações envolvendo ativação de pro-cofatores são fundamentais para a geração do complexo “tenase” intrínseco (fator IXa/fatorVIIIa), o qual converte o fator X em fator Xa, e do complexo “protrombinase” (fator Va/fator Xa), que converte a protrombina em trombina. Outro aspecto importante dessas reações é que o complexo fator IXa/fator VIIIa ativa o fator X com eficiência 50 vezes maior que o complexo fator VIIa/FT (88, 90, 96, 98, 100). O produto principal dessas reações, a trombina, exibe atividades pró-coagulantes e pró-inflamatórias, convertendo o fibrinogênio em fibrina, promovendo ativação plaquetária e ativando o fator XIII da coagulação, que por sua vez estabiliza o coágulo de fibrina (87, 94-98).

### 3.2. Mecanismos Anticoagulantes

As reações bioquímicas da coagulação do sangue devem ser estritamente reguladas de modo a evitar ativação excessiva do sistema, formação inadequada de fibrina e oclusão vascular. Em condições fisiológicas (ausência de lesão vascular) há predomínio dos mecanismos anticoagulantes sobre os procoagulantes, mantendo-se desta forma a fluidez do sangue e preservando-se a patência vascular (87).

O complexo fator VIIa/FT atua sobre os fatores IX e X da coagulação, ativando-os. Essas reações são reguladas pelo inibidor da via do fator tecidual (TFPI), uma proteína produzida pelas células endoteliais que apresenta dois mecanismos: inibição do

complexo fator VIIa/FT e do fator Xa. Assim, a ativação direta do fator X é regulada negativamente de modo rápido na presença do TFPI, que limita desta forma a produção de fator Xa e fator IXa. A ligação do fator Xa é necessária para que o TFPI exerça seu papel inibitório sobre o complexo fator VIIa/FT (101).

Outra importante via de anticoagulação do sangue é o sistema da proteína C ativada (PCa). A proteína C (PC), quando ligada ao seu receptor no endotélio (EPCR, “endothelial protein C receptor”), é ativada após a ligação da trombina ao receptor endotelial trombomodulina (TM). A PCa inibe a coagulação clivando e inativando os fatores Va e VIIIa. Este processo é potencializado pela PS, que atua como um cofator não enzimático nas reações de inativação. A identificação do sistema da PCa implicou importante mudança conceitual no que se refere ao papel da trombina no sistema hemostático: não obstante ela tenha função procoagulante quando gerada em excesso, sua função na fisiologia do sistema, em que é produzida apenas em pequenas quantidades, é de um potente anticoagulante, tendo em vista que sua ligação à TM endotelial representa o evento chave para ativação da via inibitória da PC (102-107).

A antitrombina III (ATIII) é o inibidor primário da trombina e também exerce efeito inibitório sobre diversas outras enzimas da coagulação, incluindo os fatores IXa, Xa, e XIa. Adicionalmente, a ATIII acelera a dissociação do complexo fator VIIa/fator tecidual e impede sua reassociação. Desta forma, a ATIII elimina qualquer atividade enzimática procoagulante excessiva ou indesejável. A molécula de heparan sulfato, uma proteoglicana presente na membrana das células endoteliais, acelera as reações catalisadas pela ATIII. A atividade inibitória da ATIII sobre a coagulação é também potentemente acelerada pela heparina, um polissacarídeo linear estruturalmente similar ao heparan sulfato (24, 108).

Da mesma maneira que os mecanismos pró-coagulantes, as diferentes vias regulatórias não operam isoladamente; há sinergismo entre o TFPI e a ATIII e entre o TFPI e o sistema da PC suprimindo a gênese de trombina. Por exemplo, a ATIII (mas não o TFPI) inibe a ativação do fator VII mediada pelo fator Xa no complexo fator VII/FT. Por outro lado, o TFPI (mas não a AT) inibe o excesso de ativação do fator X pelo complexo fator VII/FT. Adicionalmente, o TFPI em conjunção com o sistema da PCa inibe potentemente a gênese de trombina pelo complexo fator VII/FT (87).

### 3.3. Sistema Fibrinolítico

O sistema fibrinolítico ou sistema plasminogênio/plasmina é composto por diversas proteínas que regulam a geração de plasmina, uma enzima ativa produzida a partir do plasminogênio, que tem por função degradar a fibrina (109-114).

São conhecidos dois ativadores fisiológicos do plasminogênio: o ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) e o ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA). Os dois ativadores têm alta especificidade de ligação com seu substrato, resultando na formação de plasmina. Embora a plasmina degrade não somente a fibrina, mas também o fibrinogênio, fator V e fator VIII, em condições fisiológicas, a fibrinólise ocorre como processo que é altamente específico na presença de fibrina. Em contraste com esses mecanismos fisiológicos, ativação mais extensa do sistema fibrinolítico ocorre quando da infusão de agentes trombolíticos do tipo estreptoquinase e uroquinase, que não são específicos para a presença de fibrina (109-111).

A inibição do sistema fibrinolítico, através da inibição dos ativadores do plasminogênio, ocorre mediante ação de inibidores específicos, cujo principal representante é o PAI-1, e diretamente sobre a plasmina, função inibitória esta exercida pela  $\alpha_2$ -antiplasmina (109-111).

Recentemente, um novo componente do sistema fibrinolítico foi identificado e designado inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI). O TAFI ocupa importante papel na hemostasia funcionando como um potente inibidor da fibrinólise. O TAFI é ativado pela trombina, tripsina e plasmina, e na sua forma ativada é capaz de inibir a fibrinólise. A principal via de ativação do TAFI é dependente da ligação da trombina à trombosmodulina, um complexo que tem também a função de ativar o sistema da PC. Desta forma, o TAFI representa um ponto de conexão entre os sistemas de coagulação e fibrinolítico (112).

#### 3.4. Coagulação na Sepsis

O sistema de coagulação e as plaquetas são ativados nos estágios iniciais da sepsis, podendo ocasionar coagulopatia e trombocitopenia (8, 80). Esse processo pode progredir, levando CIVD. Apesar das manifestações hemorrágicas receberem bastante atenção, a trombose microvascular é considerada patologicamente mais importante e está fortemente ligada ao desenvolvimento da DMO (8, 11, 12, 14, 70, 115-117).

Utilizando o modelo de cascata proposto por MacFarlane, a via extrínseca é a principal responsável pela ativação do sistema de coagulação na sepsis; entretanto, a via intrínseca pode ser ativada por altas concentrações de endotoxinas bacterianas. O

FT, expresso por diferentes células, como monócitos e células endoteliais, é altamente trombogênico e, em condições normais, liberado em poucos minutos na circulação. Na sepse os monócitos circulantes e os granulócitos são as principais fontes de FT. O TNF- $\alpha$ , as IL-1 e 6, o PAF e o sistema complemento podem aumentar a expressão de FT, que forma um complexo catalítico com o fator VIIa, clivando os fatores IX e X, ativando o sistema de coagulação (9-17, 34-36, 68-74, 78-82). Além disso, na sepse os níveis de ATIII e de PCa estão diminuídos, o que constitui um mau prognóstico (14, 115).

O sistema fibrinolítico é ativado precocemente na sepse, mas inibido em pouco tempo como resultado de um importante aumento de inibidores dos ativadores do plasminogênio. O principal responsável pela inibição da fibrinólise em resposta a endotoxinas é o inibidor do PAI-1, que pode contribuir para uma redução da atividade fibrinolítica, assim favorecendo a microtrombose e a DMO (68-73).

#### 4. Tratamento da Sepses

Em novembro de 2001, uma forma recombinante humana da proteína C ativada (PCArh) foi aprovada pelo FDA para o tratamento de pacientes com sepses severa, e hoje constitui o único fármaco específico para sepses. O estudo multicêntrico, randomizado e placebo-controlado denominado PROWESS, que avaliou a utilidade do fármaco contra a sepses, revelou uma redução de 6,1% do risco absoluto de morte (mortalidade de 30,8% em 28 dias no grupo placebo contra 24,7% com PCArh). Verificou-se que apenas pacientes de alto risco apresentam redução significativa na mortalidade (44% de mortalidade no grupo de pacientes que receberam placebo contra 31% no grupo que recebeu PCArh) (19-23, 40-43).

Os mecanismos de ação da PCArh ainda não estão elucidados (19-23, 40-43), porém oferece esperança de que novas estratégias terapêuticas para o tratamento da sepses possam ser introduzidas na clínica.

## 5. Frutose-1,6-Bisfosfato

A frutose-1,6-bisfosfato (FBP) é um açúcar bisfosforilado e um metabólito da via glicolítica que desempenha um papel direto na regulação de muitas rotas metabólicas. Pode alterar o metabolismo dos carboidratos estimulando a glicólise e inibindo a gliconeogênese. Além disso, é capaz de estimular a síntese de glicogênio e, ao mesmo tempo, impedir sua degradação (118-124).

### 5.1. Efeitos Fisiológicos: Glicólise e Gliconeogênese

A FBP afeta a atividade de muitas enzimas que participam na conversão de glicose a ácido láctico. De modo geral, a FBP estimula as reações na glicólise, apesar de não ter o mesmo efeito em todas as células e em todas as espécies. A ativação da fosfofrutoquinase 1 (PFK-1) pela FBP está bem documentada; em muitos casos, esta ativação faz-se pelo bloqueio dos efeitos inibitórios de outros efetores, incluindo o ATP e a Frutose-6-fosfato (Fru-6-P) (118-120).

De uma maneira geral, a FBP não possui nenhuma ação sobre a atividade da lactato desidrogenase. Com relação à piruvatoquinase, sua ativação é bastante ambígua, mas em geral diz-se que tem uma união cooperativa com fosfoenolpiruvato e que isto é ativado pela FBP. Estudos demonstraram que a FBP inibe a fosfoglucoisomerase somente em uma direção. A FBP compete com Fru-6-P na reação inversa, mas não compete com a Gli-6-P quando a reação vai em outro sentido. Os

autores observaram que a inibição da reação inversa desta enzima leva as pessoas que possuem intolerância à frutose a ter hipoglicemia após a ingestão da mesma (122).

A enzima fosfoglicomutase catalisa, como principal reação, a interconversão de Gli-1-P e Gli-6-P, usando como cofator a Gli-1,6-P<sub>2</sub>. Esta enzima, que é inibida por ATP e citrato, pode também ser inibida pela FBP, através de um mecanismo de competição com a Gli-1,6-P<sub>2</sub> (124).

A FBP também atua na gliconeogênese inibindo enzimas. Na via usual da gliconeogênese a FBP é substrato e inibidor da Frutose-1,6-bifosfatase (123). Esta enzima pode unir fortemente dois íons metálicos (Zn<sup>++</sup>/Mn<sup>++</sup>) por molécula e nestas condições pode unir 4 moléculas de substrato. As constantes de união diminuem à medida que os substratos vão se unindo, indicando uma interação negativa à medida que aumenta o número de ligantes. Com estes dados pode-se concluir que a FBP pode ser um importante modulador da gliconeogênese (121).

A ribulose-1,5-bifosfato descarboxilase funciona no ciclo fotossintético do carbono produzindo 3-fosfoglicerato, que é posteriormente usado para a gliconeogênese. Esta reação é ativada pela Fru-6-P e bloqueada pela FBP (121).

A enzima malato desidrogenase catalisa a descarboxilação oxidativa do malato a piruvato em alguns microorganismos, incluindo *Streptococcus faecalis*. Esta enzima é induzível, mas não está regulada pela repressão metabólica. Entretanto, sua atividade é inibida por ATP e também por intermediários glicolíticos, incluindo a FBP. A isocitrato liase catalisa a transformação de isocitrato para glicoxilato e succinato em muitos microorganismos, numa reação que permite gliconeogênese a partir de intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. A enzima de *Pseudomonas indigofera* é inibida pela FBP (122).

## 5.2. Efeitos Terapêuticos

A FBP apresenta efeitos protetores sobre vários órgãos, tecidos e células, e em uma série de situações de dano celular:

### 5.2.1. Coração e Cardiomiócitos

Imediatamente após obstrução arterial inicia-se a isquemia; se o aporte energético celular não for reconstituído brevemente, há o risco de lesão irreversível. Uma das etapas críticas durante a isquemia é a inativação da PFK-1, induzida por um progressivo aumento da acidez intracelular, provocando uma diminuição da concentração de FBP (125).

Markov e colaboradores (1980), utilizando um modelo de isquemia em cães e monitorando parâmetros hemodinâmicos, eletrocardiográficos e efeitos metabólicos, e observaram que a administração FBP aos cães provocava uma melhora nas funções mecânicas do coração, visualizada pela regressão nas modificações eletrocardiográficas provocadas pela isquemia. Além disso, o tratamento com FBP aumentou significativamente o ATP e a creatinina fosfato no miocárdio normal e isquêmico. Além disso, a quantidade de ácido láctico estava aumentada, sugerindo um aumento da oxidação da glicose pela FBP. Os autores propuseram que a FBP atravessaria a membrana plasmática e ativaria a glicólise anaeróbica intracelular, inibida pela súbita diminuição do pH, provocado pela isquemia, e a conseguinte inativação da PFK-1. Além

disso, sugeriu-se que a FBP, uma vez dentro da célula, transpassaria as duas etapas de fosforilação, economizando duas moléculas de ATP (126).

O mecanismo de ação da FBP na isquemia ainda não está completamente elucidado e é objeto de estudo e discussão. O mecanismo de ação teórico de Markov foi criticado por Eddy e colaboradores (1981) afirmando que um composto bisfosforilado, portanto, uma molécula grande e polar, não sendo possível atravessar a membrana plasmática. Além disto, em perfusões do coração isquêmico, a enzima chave para a glicólise é a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e não a PFK-1. Concluiu-se que o efeito protetor da FBP existe, mas que não é um efeito direto (127). Em 2000, Ehringer e colaboradores defenderam a teoria de que a FBP atravessa a membrana plasmática por difusão passiva, de maneira intacta (isto é, não há quebra na molécula) e dose-dependente.(128) Ainda, Wheeler e colaboradores publicaram um estudo sobre os efeitos da FBP sobre células cardíacas e lipossomas, onde, utilizando FBP radiomarcada, afirmaram que a mesma seria capaz de entrar na célula não por difusão passiva através da membrana bicamada, mas através de dois mecanismos dependentes de proteína. Esta propriedade proporcionaria à FBP os efeitos protetores no coração pós-isquêmico, pois a capacidade de captação da FBP ocorreu tanto à temperatura ambiente quanto a 3°C (129).

Hassinen e colaboradores (1991), utilizando um modelo de coração perfundido, monitoraram parâmetros como o consumo de oxigênio, o fluxo coronário, a pressão sistólica intraventricular e a pressão diastólica intraventricular cardíaca. Observaram que o coração isquêmico tratado com FBP tinha o consumo de oxigênio diminuído, pressão diastólica aumentada e sistólica diminuída, e uma pequena diminuição do fluxo coronário quando se comparava ao grupo sem tratamento. Além disso, a relação NADH/NAD<sup>+</sup> aumentava na administração de FBP e com isto levava ao conseqüente

aumento de ATP. A FBP também diminuiu o cálcio iônico extracelular, o que poderia representar uma melhora no rendimento mecânico e respiratório do coração isquêmico através da diminuição do cálcio iônico extracelular. Convém ressaltar que o cálcio extracelular tem um efeito direto sobre a mecânica do coração e, portanto, os resultados obtidos podem ser particulares da ação da FBP sobre o órgão, e não um efeito geral contra a lesão celular provocada pela isquemia (130).

Em 2002, Markov e colaboradores publicaram um estudo onde a FBP, sozinha e/ou combinada com ciclosporina, diminuiu a lesão de reperfusão pós-isquêmica em transplante de coração de ratos. Além disso, os autores verificaram um aumento discreto, porém significativo, da sobrevivência pós-transplante; os níveis de proliferação de linfócitos e a expressão de IL-2 diminuída, sugerindo um efeito imunossupressor da FBP (131).

Baseado nos efeitos benéficos da FBP sobre o coração, Riedel e colaboradores (2004) conduziram um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e placebo-controlado onde pacientes submetidos à cirurgia de *bypass* da artéria coronariana recebiam FBP, em cinco diferentes doses, ou placebo. Os autores verificaram que a dose de 250 mg/kg FDP IV antes da cirurgia mais 2.5mM FBP como um aditivo cardioplégico. Estes pacientes apresentavam baixos níveis de creatino-quinase 6 horas após a reperfusão do coração, menor número de infartos perioperativos do miocárdio e índice cardíaco aumentado. Baseados nos resultados, os autores defendem o uso da FBP como protetor do miocárdio em cirurgia de *bypass* da artéria coronariana (132).

### 5.2.2. Eritrócitos

Ao incubar a FBP com sangue total humano, Lazzarino e colaboradores (1984), observaram que a principal resposta era o aumento da FBP intraeritrocitária, acompanhado por uma significativa diminuição da glicose do sangue (133). Rigobello e Galzigna (1982) mostraram que a interação da FBP com a membrana de eritrócitos induzia modificação na permeabilidade a íons, incluindo a captação de potássio e a eliminação de hidrogênios, com o conseguinte aumento do pH intracelular e ativação da PFK-1, resultando em uma estimulação da glicólise (134). Markov e colaboradores (1980) verificaram que a FBP causava um substancial aumento do 2,3-difosfoglicerato nos eritrócitos e concluíram que este efeito poderia aumentar a quantidade de oxigênio para os tecidos isquêmicos e provocar uma melhora no quadro clínico (126). Greenwald e colaboradores (2002), utilizando FBP 10mM em *pools* de eritrócitos de doadores não comprovaram estes resultados (135).

### 5.2.3. Rins

Didlake e colaboradores (1985) verificaram em ratos, depois de 30 minutos de isquemia, que o tratamento com FBP oferecia uma proteção significativa, funcional e histológica, para o rim. A taxa de filtração glomerular, de fluxo urinário e a taxa de excreção absoluta de solutos foram iguais nos animais isquêmicos tratados com FBP e nos animais controles. Isto demonstrou que a FBP oferece uma proteção parcial ao rim contra a isquemia renal. Este efeito protetor parece ser específico da FBP e não devido

à expansão do volume plasmático, já que os ratos que foram injetados com iguais volumes de solução fisiológica não foram protegidos da lesão renal. Além disso, o efeito protetor da FBP tem mecanismos diferentes daqueles que são exercidos pelo manitol ou furosemida, já que estes protegem através de um mecanismo que está relacionado com a excreção de solutos (136).

Realizando experimentos “*in vitro*”, Rizzoli e colaboradores (1990) verificaram que o álcool podia aumentar a entrada de cálcio em células renais de ratos. Este efeito é dependente da concentração de cálcio (extracelular) e, também, do tempo de incubação (137). A FBP, adicionada a diferentes concentrações durante o tempo de pré-incubação, exerceu um efeito protetor contra este fenômeno. Sugeriram que seu efeito podia ser por um mecanismo de estabilização da membrana plasmática. Estes resultados foram confirmados também “*in vivo*” através de experimentos de Galzigna e colaboradores (1989) (138).

Um estudo publicado por Antunes e colaboradores (2004) avaliou os efeitos protetores da infusão de 350mg/kg de FBP em ratos submetidos a um modelo experimental de falência renal aguda isquêmica. Os autores verificaram que a FBP aumentou a viabilidade do tecido renal, por manter o conteúdo de ATP da célula, diminuir o dano tecidual (avaliado através da diminuição da liberação de lactato desidrogenase - LDH) e preveniu a desrupção de microfilamentos das células do tubo proximal (139).

#### 5.2.4. Sistema Nervoso Central

Gregory e colaboradores (1989 e 1990) e Vexler e colaboradores (2002) investigando culturas de astrócitos demonstraram em células submetidas à hipóxia que a liberação de LDH diminuía quando se adicionava FBP ao meio de cultura. Observaram, também, que outros análogos da frutose, assim como outros metabólitos da rota glicolítica, não tinham um efeito protetor significativo. Além disso, verificaram que a FBP atenuava a diminuição do ATP provocado pela hipóxia, através da preservação dos níveis de ATP, o que impedia a lesão celular (140-142). Em 1995, Kelleher propôs a hipótese de que os efeitos da FBP sobre os astrócitos não seriam por sua propriedade de ser um substrato para a glicólise, por sua inabilidade de penetrar na célula em quantidades suficientes para aumentar o aporte energético. (143). Donohoe e colaboradores (2001) observaram não só a preservação dos níveis de ATP, mas também a capacidade de estabilização dos níveis de  $Ca^{++}$  durante a hipóxia. Este efeito não é devido à inibição do receptor de glutamato ou quelação de cálcio, mas via sinalização da fosfolipase C-dependente (PLC) (144).

Farias e colaboradores (1989) provaram a ação da FBP sobre as funções e metabolismo cerebral em coelhos sujeitos a coma hipoglicêmico. Utilizaram o eletroencefalograma e a diferença arterio-venosa na concentração de oxigênio como indicadores da atividade metabólica. Concluíram que a FBP podia melhorar as funções e metabolismo do cérebro e sugeriram que podia substituir, em parte, a glicose durante a hipoglicemia, sendo um substrato alternativo para a glicólise quando o metabolismo cerebral dos carboidratos estava diminuído (145). A partir destes achados, os autores realizaram outro estudo a fim de verificar se a FBP poderia ter um efeito protetor para o cérebro durante a isquemia anóxica. Os animais tratados com FBP apresentavam

menos alterações neurológicas que os animais controles, o que sugere a existência de um efeito protetor para o cérebro durante a isquemia anóxica (146).

O efeito neuroprotetor da FBP também foi observado a em *slices* de cérebros de ratos submetidos à hipóxia. Sugere-se também que o açúcar atue como protetor do sistema nervoso central quando administrado intraperitonealmente. Este efeito da FBP não parece muito fácil de explicar, devido à grande seletividade da barreira hematoencefálica. É muito pouco provável que o açúcar possa penetrar no cérebro, sugerindo que o efeito da droga é indireto (147).

Rogido e colaboradores (2003) demonstraram que a FBP previne a morte neuronal excitotóxica no cérebro de camundongos neonatos; os autores não buscaram mecanismos para este efeito, e admitem que a modulação de cálcio intracelular através da ativação da PLC é a responsável pelo efeito protetor (148). Já Park e colaboradores (2004) e Song e colaboradores (2005) propõem que a neuroproteção em modelos de excitotoxicidade ocorre através da alteração de espécies reativas ao oxigênio (EROs), via p38MAPK e ERK, que são proteíno-quinases envolvidas na regulação e morte neuronal. A FBP controlaria a produção excessiva destas proteíno-quinases. Song também admite um efeito modulador da FBP sobre a PLC em *slices* de hipocampo de ratos em modelo de toxicidade induzida por  $\beta$ -amilóides (149, 150).

#### 5.2.5. Fígado

O composto polihalogenado Tetracloreto de Carbono ( $\text{CCl}_4$ ) é um conhecido agente hepatotóxico que pode levar à morte. Rao e Mehendale (1989) estudaram o papel

protetor da FBP contra a hepatotoxicidade provocada por CCl<sub>4</sub>. Observaram que as enzimas plasmáticas marcadoras de dano hepático AST (Aspartato amino transferase) e ALT (Aspartato alanina transferase), estavam significativamente menos aumentadas nos animais tratados com FBP do que naqueles que não receberam tratamento. O ATP e ADP, que diminuía pela ação do tóxico, recuperavam-se parcialmente pela ação da FBP; as enzimas ornitina-descarboxilase e espermidina N-acetiltransferase, que são importantes para a regeneração celular, também estavam significativamente mais aumentadas nos animais tratados. (151) . Em outro estudo os autores encontraram efeitos protetores hepáticos da FBP mesmo quando utilizaram como agente tóxico a clordecona em combinação com CCl<sub>4</sub> (152).

Markov e colaboradores (1989), verificaram que a FBP protege o fígado do dano utilizando como agente hepatóxico a galactosamina. Neste estudo foram utilizados parâmetros histológicos e marcadores plasmáticos da lesão hepática (AST e ALT) (153). O uso de galactosamina em conjunto com FBP mostrou-se menos lesivo do que no grupo controle (154). Em outro modelo experimental, a FBP apresentou efeitos protetores contra a lesão hepática induzida por paracetamol (155). Estes estudos utilizaram como parâmetros de lesão marcadores plasmáticos e celulares (ATP).

#### 5.2.6. Proteção Anti-Radicais Livres (RL)

A formação de radicais livres na reperfusão pós-isquêmica ou através de substâncias tóxicas parece ser um mecanismo importante no desenvolvimento da lesão celular. Para protegerem-se destes efeitos citotóxicos, as células possuem mecanismos enzimáticos antioxidantes tais como enzimas (superóxido dismutase, catalase) ou

antioxidante endógenos (ácido ascórbico, vitamina E). Sugeriu-se que o ATP pode ser um regulador fisiológico da atividade catalítica da enzima NADP oxidase, uma das enzimas responsáveis da produção de radicais superóxidos. Em 1986, Schinetti e Lazzarino, utilizando um éster de forbol (miristato acetato de forbol) para produzir radicais superóxido em neutrófilos humanos *in vitro*, verificaram que o tratamento prévio destas células com FBP inibia a produção de radicais superóxido provocada pela ação do éster de forbol. O mecanismo com que o açúcar diminuiu a formação destes radicais parece ser através do aumento dos níveis intracelulares de ATP, já que o éster de forbol provocava uma diminuição deste metabólito em aproximadamente 85%. Além disso, verificou-se que a FBP impedia o metabolismo oxidativo de neutrófilos e inibia a liberação de histamina pelos mastócitos, sugerindo que o açúcar poderia ter um efeito antiinflamatório (156).

A anóxia pode induzir uma transformação de xantina-desidrogenase em xantina-oxidase; este sistema enzimático pode formar radicais superóxidos como consequência da diminuição do metabolismo energético e o consequente aumento no conteúdo de AMP. Sob as mesmas condições de anóxia, notou-se que a FBP pode manter a relação xantina-desidrogenase/xantina-oxidase através da recuperação da carga energética que está diminuída durante a anóxia (157).

Cárdenas e colaboradores (2000) incubaram 5mM de FBP em *slices* de cérebros de ratos submetidos a hipóxia e privação de glicose, observaram a inibição da atividade da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e redução significativa dos níveis de glutamato e aspartato. Esta redução é uma das razões para acreditar que a FBP possa exercer um efeito neuroprotetor (158).

#### 5.2.7. Inibição da Agregação Plaquetária *In Vitro*

Cavallini e colaboradores (1992) demonstraram que a FBP (1 - 3mM) inibe a agregação plaquetária *in vitro* em indivíduos sadios induzida por diversos agonistas trombina, vasopressina, PAF, ADP, adrenalina, araquidonato e um análogo estável do tromboxano U 44069. Neste estudo, embora não tenha sido elucidado o mecanismo de ação para tal efeito, a ação antiagregante plaquetária foi atribuída à inibição da secreção de ATP induzida por trombina; foi também observada uma ação quelante do  $Ca^{++}$  extracelular, o que também pode representar um mecanismo de ação. Além disto, os autores destacam a improbabilidade de a FBP exercer seus efeitos através da penetração na membrana celular, sendo mais provável que atue via interferência de sinal na superfície celular, no receptor G do sistema PLC (159).

#### 5.2.8. Ação Antiinflamatória

Oyanagui (1998), comprovou o efeito antiinflamatório da FBP quando associada à dexametasona em edema de pata de ratos (160). Cuesta e colaboradores (2006) avaliaram o efeito protetor da endotoxemia, ativação de macrófagos e dano hepático em modelo de hepatite experimental em ratos induzida por D-galactosamina (GalN), e verificaram que a FBP não previne a sensibilização induzida ao TNF- $\alpha$  pela GalN, mas previne o aumento de transaminases hepáticas, por diminuição da liberação de citocinas inflamatórias. Os autores sugerem que esta ação é mediada pela ação da FBP sobre canais de potássio ( $K^+$ ), aumentando a permeabilidade destes canais (161).

Nunes e colaboradores verificaram em 2003 um efeito imunomodulador da FBP em linfócitos T em ratos submetidos à sepse experimental (162); em 2004 os autores avaliaram os efeitos da FBP e clorpropamida sobre receptores solúveis de TNF- $\alpha$  em linfócitos de doadores hígidos. Os resultados mostraram que a FBP é um potente imunomodulador, confirmando os resultados do estudo anterior; FBP, em concentrações entre 1,25 e 10mM reduziram significativamente a proliferação linfocitária induzida por fitohemaglutinina (PHA)(163).

Em 2002, Nunes e colaboradores publicaram um estudo com o intuito de avaliar os efeitos protetores da FBP na sepse em ratos, em um modelo onde é introduzida via intraperitoneal uma cápsula de gelatina contendo *Escherichia coli* em fezes estéreis de ratos. Os animais foram divididos em três grupos: um grupo controle *sham*, um grupo séptico e, um grupo séptico tratado com frutose-1,6-bisfosfato (500mg/kg). No grupo controle não houve mortalidade; no grupo séptico houve 100% de mortalidade em 15 horas, enquanto que no grupo que recebeu frutose-1,6-bisfosfato houve uma sobrevivência de 80% dos animais em 15 horas, 70% em 24 horas e 50% em 48 horas. Esses dados demonstraram a ação protetora dessa droga no quadro séptico (164). Em outros trabalhos, no intuito de determinar os mecanismos protetores da FBP, o mesmo grupo avaliou possíveis ações antimicrobianas na sepse e antiinflamatórias em modelo de edema de pata (165) e pleurisia (166) induzidas por carragenina. Verificou-se que a FBP não possui efeito antimicrobiano (165), mas possui antiinflamatório na dose de 500mg/kg (165, 166). A dose letal média intravenosa em ratos é de 1068mg/kg em 24 horas (167).

## JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Considerando-se o impacto da sepse na sociedade, principalmente no que diz respeito às altas taxas de morbi-mortalidade e prevalência, faz-se necessária a pesquisa de novas intervenções preventivas e/ou curativas. A FBP é um açúcar bisfosforilado que apresenta efeitos protetores em diversas situações de dano celular e orgânico. Para que essa substância possa futuramente ser utilizada de forma segura no tratamento da sepse, novos estudos devem ser realizados. O presente trabalho propôs o estudo das propriedades terapêuticas FBP sobre as anormalidades na coagulação sanguínea e a na agregação plaquetária causadas pela sepse experimental em ratos.

## REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001 Jul;29(7):1303-10.
2. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*. 1996 Jul;22(7):707-10.
3. Opal SM, Esmon CT. Bench-to-bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care*. 2003 Feb;7(1):23-38.
4. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003 Apr 17;348(16):1546-54.
5. Silva E, Othero J. Consenso Brasileiro de Sepse. 2003.
6. Lomar FP. Manifestações Clínicas: Caracterização Inicial da Doença. In: Silva FP, Velasco IT, editors. *Sepse*. First ed. São Paulo: Manole; 2007. p. 19-27.
7. Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care*. 2004 Aug;8(4):R251-60.
8. ten Cate H, Schoenmakers SH, Franco R, Timmerman JJ, Groot AP, Spek CA, et al. Microvascular coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med*. 2001 Jul;29(7 Suppl):S95-7; discussion S7-8.
9. van der Poll T. Coagulation and inflammation. *J Endotoxin Res*. 2001;7(4):301-4.

10. Opal SM. Interactions between coagulation and inflammation. *Scand J Infect Dis.* 2003;35(9):545-54.
11. Marshall JC. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med.* 2001 Jul;29(7 Suppl):S99-106.
12. Mammen EF. The haematological manifestations of sepsis. *J Antimicrob Chemother.* 1998 Jan;41 Suppl A:17-24.
13. Levi M, van der Poll T. Coagulation in sepsis: all bugs bite equally. *Crit Care.* 2004 Apr;8(2):99-100.
14. Levi M, de Jonge E, van der Poll T. Sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Thrombolysis.* 2003 Aug-Oct;16(1-2):43-7.
15. le Roux P. An update on the pathophysiology of sepsis. *Sadj.* 2004 May;59(4):163, 5.
16. Jagneaux T, Taylor DE, Kantrow SP. Coagulation in sepsis. *Am J Med Sci.* 2004 Oct;328(4):196-204.
17. Jacobi J. Pathophysiology of sepsis. *Am J Health Syst Pharm.* 2002 Feb 15;59 Suppl 1:S3-8.
18. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. The enigma of sepsis. *J Clin Invest.* 2003 Aug;112(4):460-7.
19. Vincent JL, Bernard GR, Beale R, Doig C, Putensen C, Dhainaut JF, et al. Drotrecogin alfa (activated) treatment in severe sepsis from the global open-label trial ENHANCE: further evidence for survival and safety and implications for early treatment. *Crit Care Med.* 2005 Oct;33(10):2266-77.
20. Kanji S, Devlin JW, Piekos KA, Racine E. Recombinant human activated protein C, drotrecogin alfa (activated): a novel therapy for severe sepsis. *Pharmacotherapy.* 2001 Nov;21(11):1389-402.

21. Higgins TL, Steingrub JS, Tereso GJ, Tidswell MA, McGee WT. Drotrecogin alfa (activated) in sepsis: initial experience with patient selection, cost, and clinical outcomes. *J Intensive Care Med.* 2005 Nov-Dec;20(6):339-45.
22. Haley M, Cui X, Minneci PC, Deans KJ, Natanson C, Eichacker PQ. Recombinant human activated protein C in sepsis: assessing its clinical use. *Am J Med Sci.* 2004 Oct;328(4):215-9.
23. Bernard GR. Drotrecogin alfa (activated) (recombinant human activated protein C) for the treatment of severe sepsis. *Crit Care Med.* 2003 Jan;31(1 Suppl):S85-93.
24. Wiedermann CJ, Hoffmann JN, Juers M, Ostermann H, Kienast J, Briegel J, et al. High-dose antithrombin III in the treatment of severe sepsis in patients with a high risk of death: efficacy and safety. *Crit Care Med.* 2006 Feb;34(2):285-92.
25. Roemisch J, Gray E, Hoffmann JN, Wiedermann CJ. Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2002 Dec;13(8):657-70.
26. Riedemann NC, Ward PA. Anti-inflammatory strategies for the treatment of sepsis. *Expert Opin Biol Ther.* 2003 Apr;3(2):339-50.
27. Rice TW, Bernard GR. Advances in Sepsis Treatment. *Curr Infect Dis Rep.* 2004 Oct;6(5):354-60.
28. Kienast J, Juers M, Wiedermann CJ, Hoffmann JN, Ostermann H, Strauss R, et al. Treatment effects of high-dose antithrombin without concomitant heparin in patients with severe sepsis with or without disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Haemost.* 2006 Jan;4(1):90-7.
29. Hoffmann JN, Wiedermann CJ, Juers M, Ostermann H, Kienast J, Briegel J, et al. Benefit/risk profile of high-dose antithrombin in patients with severe sepsis treated with and without concomitant heparin. *Thromb Haemost.* 2006 May;95(5):850-6.

30. Hoffmann JN, Muhlhaber D, Jochum M, Inthorn D. Effect of long-term and high-dose antithrombin supplementation on coagulation and fibrinolysis in patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* 2004 Sep;32(9):1851-9.
31. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992 Jun;20(6):864-74.
32. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, et al. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med.* 1990 Aug 1;113(3):227-42.
33. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest.* 1997 Jul;112(1):235-43.
34. Esmon CT, Taylor FB, Jr., Snow TR. Inflammation and coagulation: linked processes potentially regulated through a common pathway mediated by protein C. *Thromb Haemost.* 1991 Jul 12;66(1):160-5.
35. Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol.* 2005 Nov;131(4):417-30.
36. Esmon CT. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas.* 2004 Apr 15;47(4):305-14.
37. Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest.* 1993 Feb;103(2):565-75.
38. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood.* 2003 May 15;101(10):3765-77.

39. Aird WC. Vascular bed-specific hemostasis: role of endothelium in sepsis pathogenesis. *Crit Care Med*. 2001 Jul;29(7 Suppl):S28-34; discussion S-5.
40. Rudis MI, Fish DN. Pharmacology, clinical efficacy, and safety of drotrecogin alfa (activated). *Pharmacotherapy*. 2002 Dec;22(12 Pt 2):182S-95S.
41. Griffin JH, Zlokovic B, Fernandez JA. Activated protein C: potential therapy for severe sepsis, thrombosis, and stroke. *Semin Hematol*. 2002 Jul;39(3):197-205.
42. Garces K. Activated protein C for severe sepsis. *Issues Emerg Health Technol*. 2002 Mar(30):1-4.
43. Frampton JE, Foster RH. Drotrecogin alfa (activated): a pharmacoeconomic review of its use in severe sepsis. *Pharmacoeconomics*. 2004;22(7):445-76.
44. Harmening DM LL. Hemostasis and introduction to thrombosis. In: Harmening DM, editor. *Clinical hematology and fundamentals of hemostasis*. Third ed. Philadelphia: F. A. Davis Company; 1997. p. 743.
45. Parise LV, Smyth SS, Collar BS. Chapter 111: Platelet Morphology, Biochemistry and Function. In: Beutler E, editor. *William's Hematology*. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 983-1014.
46. Levi M. Platelets in sepsis. *Hematology*. 2005;10 Suppl 1:129-31.
47. Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev*. 1989 Jan;69(1):58-178.
48. Science Photo Library. 07.08.2007 [cited 2007 07.08.2007]; Available from: <http://www.sciencephotolibrary.com>
49. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962 Jun 9;194:927-9.

50. von Kugelgen I, Wetter A. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000 Nov;362(4-5):310-23.
51. Pelagalli A. LP, et al. Species variability in platelet aggregation response to different agonists. *J Comp Path.* 2002;127:126-32.
52. Dwyer SD, Meyers KM. Rat platelet aggregation: strain and stock variations. *Thromb Res.* 1986 Apr 1;42(1):49-53.
53. Kurata M, Horii I. Blood coagulation tests in toxicological studies--review of methods and their significance for drug safety assessment. *J Toxicol Sci.* 2004 Feb;29(1):13-32.
54. Emms H, Lewis GP. Sex and hormonal influences on platelet sensitivity and coagulation in the rat. *Br J Pharmacol.* 1985 Nov;86(3):557-63.
55. Dwyer SD, Meyers KM. Anesthetics and anticoagulants used in the preparation of rat platelet-rich-plasma alter rat platelet aggregation. *Thromb Res.* 1986 Apr 15;42(2):139-51.
56. O'Brien JR, Shoobridge SM, Finch WJ. Comparison of the effect of heparin and citrate on platelet aggregation. *J Clin Pathol* 1969;22:28-31.
57. Evans GO, Flynn RM. Further observations on in vitro aggregation of rat platelets with different collagens. *Thromb Res.* 1989;57:301-3.
58. Pinon JF. In vivo study of platelet aggregation in rats. *J Pharmacol Methods.* 1984 Sep;12(2):79-84.
59. Lasch P, Jakobs KH. Agonistic and antagonistic effects of various alpha-adrenergic agonists in human platelets. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1979 Mar 20;306(2):119-25.
60. Yu S, Latour J. Potentiation by alpha and beta-adrenergic stimulation of rat platelet aggregation. *Thromb Haemostasis.* 1977;37:413-22.

61. Yun-Choi HS, Park KM, Pyo MK. Epinephrine induced platelet aggregation in rat platelet-rich plasma. *Thromb Res.* 2000 Dec 15;100(6):511-8.
62. Yaguchi A LF, Vincent J-L, Pradier O. Platelet function in sepsis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2004;2:2096-102.
63. Leytin V, Shakoor S, Mody M, Allen D, Garvey B, Freedman J. Sepsis- and endotoxemia-generated cytokines do not trigger activation of human platelets. *Crit Care Med.* 2002 Dec;30(12):2771-3.
64. Cowan DH BL, Fratianne RB, Ahmed F. Platelet aggregation as a sign of septicemia in thermal injury. *JAMA.* 1976;235:1230-4.
65. Itoh H CC, Douglas GJ, Page CP. . Platelet accumulation induced by bacterial endotoxin in rats. *Thrombosis Research.* 1996;83:405-19.
66. Vincent JL, Yagushi A, Pradier O. Platelet function in sepsis. *Crit Care Med.* 2002 May;30(5 Suppl):S313-7.
67. Weiss HJ, Rogers J. Thrombocytopenia due to abnormalities in platelet release reaction- studies on six unrelated patients. *Blood.* 1972 Feb;39(2):187-96.
68. Aird WC. Sepsis and coagulation. *Crit Care Clin.* 2005 Jul;21(3):417-31.
69. Amaral A, Opal SM, Vincent JL. Coagulation in sepsis. *Intensive Care Med.* 2004 Jun;30(6):1032-40.
70. Bauer PR. Microvascular responses to sepsis: clinical significance. *Pathophysiology.* 2002 Jun;8(3):141-8.
71. Boos CJ, Goon PK, Lip GY. The endothelium, inflammation, and coagulation in sepsis. *Clin Pharmacol Ther.* 2006 Jan;79(1):20-2.

72. Dellinger RP. Inflammation and coagulation: implications for the septic patient. *Clin Infect Dis*. 2003 May 15;36(10):1259-65.
73. Esmon CT. Coagulation and inflammation. *J Endotoxin Res*. 2003;9(3):192-8.
74. Esmon CT, Fukudome K, Mather T, Bode W, Regan LM, Stearns-Kurosawa DJ, et al. Inflammation, sepsis, and coagulation. *Haematologica*. 1999 Mar;84(3):254-9.
75. Gattinoni L, Vagginelli F, Taccone P, Carlesso E, Bertoja E. Sepsis: state of the art. *Minerva Anesthesiol*. 2003 Jun;69(6):539-54, 54-61.
76. Hack CE, Zeerleder S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med*. 2001 Jul;29(7 Suppl):S21-7.
77. Levi M. Platelets at a crossroad of pathogenic pathways in sepsis. *J Thromb Haemost*. 2004 Dec;2(12):2094-5.
78. Levi M, Keller TT, van Gorp E, ten Cate H. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res*. 2003 Oct 15;60(1):26-39.
79. Levi M, ten Cate H, van der Poll T. Endothelium: interface between coagulation and inflammation. *Crit Care Med*. 2002 May;30(5 Suppl):S220-4.
80. Mavrommatis AC, Theodoridis T, Orfanidou A, Roussos C, Christopoulou-Kokkinou V, Zakyntinos S. Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit Care Med*. 2000 Feb;28(2):451-7.
81. Vallet B, Wiel E. Endothelial cell dysfunction and coagulation. *Crit Care Med*. 2001 Jul;29(7 Suppl):S36-41.
82. Vincent JL. Infection/inflammation and hemostasis. *Curr Hematol Rep*. 2003 Sep;2(5):407-10.

83. Almqvist P, Kuenzig M, Schwartz SI. The effect of naloxone and cyproheptadine on pulmonary platelet trapping, hypotension, and platelet aggregability in traumatized dogs. *J Trauma*. 1983 May;23(5):405-7.
84. Beijer L BJ, Crook P, Oyekan AO, Page CP, Rylander R. . The involvement of platelet activating factor in endotoxin-induced pulmonary platelet recruitment in the guinea-pig. *Br J Pharmacol*. 1987;92:803-8.
85. Boldt J, Muller M, Rothe A, Lenzen P, Hempelmann G. Does continuous heparinization influence platelet function in the intensive care patient? *Intensive Care Med*. 1997 May;23(5):567-73.
86. Shapiro AD. Platelet function disorders. *Haemophilia*. 2000 Jul;6 Suppl 1:120-7.
87. Moran TA, Viele CS. Normal clotting. *Semin Oncol Nurs*. 2005 Nov;21(4 Suppl 1):1-11.
88. Stassen JM, Arnout J, Deckmyn H. The hemostatic system. *Curr Med Chem*. 2004 Sep;11(17):2245-60.
89. Sere KM, Hackeng TM. Basic mechanisms of hemostasis. *Semin Vasc Med*. 2003 Feb;3(1):3-12.
90. Lasne D, Jude B, Susen S. From normal to pathological hemostasis. *Can J Anaesth*. 2006 Jun;53(6 Suppl):S2-11.
91. Hambleton J, Leung LL, Levi M. Coagulation: consultative hemostasis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2002:335-52.
92. Macfarlane RG. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature*. 1964 May 2;202:498-9.
93. Yarovaya GA, Blokhina TB, Neshkova EA. Contact system. New concepts on activation mechanisms and bioregulatory functions. *Biochemistry (Mosc)*. 2002 Jan;67(1):13-24.

94. Satran R, Almog Y. The coagulopathy of sepsis: pathophysiology and management. *Isr Med Assoc J.* 2003 Jul;5(7):516-20.
95. Gross PL, Aird WC. The endothelium and thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2000;26(5):463-78.
96. Roubey RA. Tissue factor pathway and the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun.* 2000 Sep;15(2):217-20.
97. Wolberg AS. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev.* 2007 May;21(3):131-42.
98. van Hinsbergh VW. The endothelium: vascular control of haemostasis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001 Apr;95(2):198-201.
99. Verhamme P, Hoylaerts MF. The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis. *Acta Clin Belg.* 2006 Sep-Oct;61(5):213-9.
100. Eigenbrot C, Kirchhofer D. New insight into how tissue factor allosterically regulates factor VIIa. *Trends Cardiovasc Med.* 2002 Jan;12(1):19-26.
101. Eigenbrot C. Structure, function, and activation of coagulation factor VII. *Curr Protein Pept Sci.* 2002 Jun;3(3):287-99.
102. O'Brien LA, Gupta A, Grinnell BW. Activated protein C and sepsis. *Front Biosci.* 2006;11:676-98.
103. Espana F, Medina P, Navarro S, Zorio E, Estelles A, Aznar J. The multifunctional protein C system. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents.* 2005 Apr;3(2):119-31.
104. D'Angelo A, Della Valle P, Giudici D, Vigano D'Angelo S. [Protein C and coagulation in sepsis]. *Minerva Anesthesiol.* 2004 May;70(5):339-50.

105. Dahlback B. Progress in the understanding of the protein C anticoagulant pathway. *Int J Hematol.* 2004 Feb;79(2):109-16.
106. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest.* 2003 Sep;124(3 Suppl):26S-32S.
107. Esmon CT. Protein C anticoagulant pathway and its role in controlling microvascular thrombosis and inflammation. *Crit Care Med.* 2001 Jul;29(7 Suppl):S48-51; discussion -2.
108. Adams TE, Huntington JA. Thrombin-cofactor interactions: structural insights into regulatory mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Aug;26(8):1738-45.
109. Dobrovolsky AB, Titaeva EV. The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components. *Biochemistry (Mosc).* 2002 Jan;67(1):99-108.
110. Sidelmann JJ, Gram J, Jespersen J, Kluft C. Fibrin clot formation and lysis: basic mechanisms. *Semin Thromb Hemost.* 2000;26(6):605-18.
111. Gurewich V. Fibrinolysis: an unfinished agenda. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2000 Jul;11(5):401-8.
112. Bouma BN, Mosnier LO. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)--how does thrombin regulate fibrinolysis? *Ann Med.* 2006;38(6):378-88.
113. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol.* 2005 May;129(3):307-21.
114. Medved L, Nieuwenhuizen W. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb Haemost.* 2003 Mar;89(3):409-19.
115. Fourrier F, Chopin C, Goudemand J, Hendrycx S, Caron C, Rime A, et al. Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation. Compared patterns of antithrombin III, protein C, and protein S deficiencies. *Chest.* 1992 Mar;101(3):816-23.

116. Vincent JL, De Backer D. Does disseminated intravascular coagulation lead to multiple organ failure? *Crit Care Clin.* 2005 Jul;21(3):469-77.
117. Dixon B. The role of microvascular thrombosis in sepsis. *Anaesth Intensive Care.* 2004 Oct;32(5):619-29.
118. Chlouverakis C. The lipolytic action of fructose-1-6-diphosphate. *Metabolism.* 1968 Aug;17(8):708-16.
119. Ramaiah A. Regulation of glycolysis in skeletal muscle. *Life Sci.* 1976 Aug 15;19(4):455-65.
120. Tornheim K, Lowenstein JM. Control of phosphofructokinase from rat skeletal muscle. Effects of fructose diphosphate, AMP, ATP, and citrate. *J Biol Chem.* 1976 Dec 10;251(23):7322-8.
121. Roig T, De Oliveira JR, Bartrons R, Bermudez J. Fructose 1,6-bisphosphate protects against D-galactosamine toxicity in isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol.* 1994 Jun;266(6 Pt 1):C1722-8.
122. Kirtley ME, McKay M. Fructose-1,6-bisphosphate, a regulator of metabolism. *Mol Cell Biochem.* 1977 Dec 29;18(2-3):141-9.
123. Benkovic SJ, deMaine MM. Mechanism of action of fructose 1,6-bisphosphatase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1982;53:45-82.
124. Bartrons R, Carreras M, Climent F, Carreras J. Inhibition of phosphoglucomutase by fructose 2,6-bisphosphate. *Biochim Biophys Acta.* 1985 Sep 27;842(1):52-5.
125. Farias LA, Willis M, Gregory GA. Effects of fructose-1,6-diphosphate, glucose, and saline on cardiac resuscitation. *Anesthesiology.* 1986 Dec;65(6):595-601.

126. Markov AK, Oglethorpe NC, Blake TM, Lehan PH, Hellems HK. Hemodynamic, electrocardiographic, and metabolic effects of fructose diphosphate on acute myocardial ischemia. *Am Heart J*. 1980 Nov;100(5):639-46.
127. Eddy LJ, Chambers D, Honig S, Downey JM. Lack of a direct metabolic effect of fructose, 1,6-diphosphate in ischemic myocardium. *Am J Physiol*. 1981 Oct;241(4):H576-82.
128. Ehringer WD, Chiang B, Chien S. The uptake and metabolism of fructose-1,6-diphosphate in rat cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem*. 2001 May;221(1-2):33-40.
129. Wheeler TJ, McCurdy JM, denDekker A, Chien S. Permeability of fructose-1,6-bisphosphate in liposomes and cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem*. 2004 Apr;259(1-2):105-14.
130. Hassinen IE, Nuutinen EM, Ito K, Nioka S, Lazzarino G, Giardina B, et al. Mechanism of the effect of exogenous fructose 1,6-bisphosphate on myocardial energy metabolism. *Circulation*. 1991 Feb;83(2):584-93.
131. Markov AK, Rayburn TS, Talton DS, Netherland DE, Moore C, Heath B, et al. Fructose-1,6-diphosphate alone and in combination with cyclosporine potentiates rat cardiac allograft survival and inhibits lymphocyte proliferation and interleukin-2 expression. *Transplantation*. 2002 Dec 15;74(11):1651-4.
132. Riedel BJ, Gal J, Ellis G, Marangos PJ, Fox AW, Royston D. Myocardial protection using fructose-1,6-diphosphate during coronary artery bypass graft surgery: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Anesth Analg*. 2004 Jan;98(1):20-9, table of contents.
133. Lazzarino G, Cattani L, Costrini R, Mulieri L, Candiani A, Galzigna L. Increase of intraerythrocytic fructose-1,6-diphosphate after incubation of whole human blood with fructose-1,6-diphosphate. *Clin Biochem*. 1984 Feb;17(1):42-5.
134. Rigobello MP, Bianchi M, Deana R, Galzigna L. Interaction of fructose-1,6-diphosphate with some cell membranes. *Agressologie*. 1982 Apr;23(2):63-6.

135. Greenwalt TJ, Gormas JF, Rugg N, Rios J, Goldsmith JC, Prokopczuk E, et al. Evaluation of fructose diphosphate in RBC preservation. *Transfusion*. 2002 Mar;42(3):384-5.
136. Didlake R, Kirchner KA, Lewin J, Bower JD, Markov A. Protection from ischemic renal injury by fructose-1,6-diphosphate infusion in the rat. *Circ Shock*. 1985;16(2):205-12.
137. Rizzoli V, Battilana G, Galzigna L. Fructose-1,6-diphosphate counteracts ethanol-stimulated calcium uptake in isolated BHK cells. *Mol Cell Biochem*. 1990 Jun 1;95(1):89-93.
138. Galzigna L, Bianchi M, Rizzoli V, Scuri R, Giannetti P, Paesano A. Fructose-1,6-diphosphate as an in vitro and in vivo anti-alcohol agent in the rat. *Cell Biochem Funct*. 1990 Jan;8(1):39-47.
139. Antunes N, Martinusso CA, Takiya CM, da Silva AJ, de Ornellas JF, Elias PR, et al. Fructose-1,6 diphosphate as a protective agent for experimental ischemic acute renal failure. *Kidney Int*. 2006 Jan;69(1):68-72.
140. Gregory GA, Welsh FA, Yu AC, Chan PH. Fructose-1,6-bisphosphate reduces ATP loss from hypoxic astrocytes. *Brain Res*. 1990 May 21;516(2):310-2.
141. Gregory GA, Yu AC, Chan PH. Fructose-1,6-bisphosphate protects astrocytes from hypoxic damage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1989 Feb;9(1):29-34.
142. Vexler Z, Berrios M, Ursell PC, Sola A, Ferriero DM, Gregory GA. Toxicity of fructose-1,6-bisphosphate in developing normoxic rats. *Pharmacol Toxicol*. 1999 Mar;84(3):115-21.
143. Kelleher JA, Chan PH, Chan TY, Gregory GA. Energy metabolism in hypoxic astrocytes: protective mechanism of fructose-1,6-bisphosphate. *Neurochem Res*. 1995 Jul;20(7):785-92.
144. Donohoe PH, Fahlman CS, Bickler PE, Vexler ZS, Gregory GA. Neuroprotection and intracellular Ca<sup>2+</sup> modulation with fructose-1,6-bisphosphate during in vitro hypoxia-ischemia involves phospholipase C-dependent signaling. *Brain Res*. 2001 Nov 2;917(2):158-66.

145. Farias LA, Sun J, Markov AK. Improved brain metabolism with fructose 1-6 diphosphate during insulin-induced hypoglycemic coma. *Am J Med Sci.* 1989 May;297(5):294-9.
146. Farias LA, Smith EE, Markov AK. Prevention of ischemic-hypoxic brain injury and death in rabbits with fructose-1,6-diphosphate. *Stroke.* 1990 Apr;21(4):606-13.
147. Bickler PE, Buck LT. Effects of fructose-1,6-bisphosphate on glutamate release and ATP loss from rat brain slices during hypoxia. *J Neurochem.* 1996 Oct;67(4):1463-8.
148. Rogido M, Husson I, Bonnier C, Lallemand MC, Merienne C, Gregory GA, et al. Fructose-1,6-bisphosphate prevents excitotoxic neuronal cell death in the neonatal mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003 Feb 16;140(2):287-97.
149. Park JY, Kim EJ, Kwon KJ, Jung YS, Moon CH, Lee SH, et al. Neuroprotection by fructose-1,6-bisphosphate involves ROS alterations via p38 MAPK/ERK. *Brain Res.* 2004 Nov 12;1026(2):295-301.
150. Song X, Wu B, Takata T, Wang X, Oizumi XS, Akisaki T, et al. Neuroprotective effect of D-fructose-1,6-bisphosphate against beta-amyloid induced neurotoxicity in rat hippocampal organotypic slice culture: involvement of PLC and MEK/ERK signaling pathways. *Kobe J Med Sci.* 2005;51(5-6):73-83.
151. Rao SB, Mehendale HM. Protective role of fructose 1,6-bisphosphate during CCl<sub>4</sub> hepatotoxicity in rats. *Biochem J.* 1989 Sep 15;262(3):721-5.
152. Rao SB, Mehendale HM. Protection from chlordecone (Kepone)-potentiated CCl<sub>4</sub> hepatotoxicity in rats by fructose 1,6-diphosphate. *Int J Biochem.* 1989;21(9):949-54.
153. Markov AK, Farias LA, Bennett WS, Subramony C, Mihas AA. Prevention of galactosamine-induced hepatotoxicity in rats with fructose-1,6-diphosphate. *Pharmacology.* 1991;43(6):310-7.

154. De Oliveira JR, Rosa JL, Ambrosio S, Bartrons R. Effect of galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism: protective role of fructose 1,6-bisphosphate. *Hepatology*. 1992 Jun;15(6):1147-53.
155. Martin FL, McLean AE. Comparison of protection by fructose against paracetamol injury with protection by glucose and fructose-1,6-diphosphate. *Toxicology*. 1996 Apr 30;108(3):175-84.
156. Schinetti ML, Lazzarino G. Inhibition of phorbol ester-stimulated chemiluminescence and superoxide production in human neutrophils by fructose 1,6-diphosphate. *Biochem Pharmacol*. 1986 May 15;35(10):1762-4.
157. Tavazzi B, Starnes JW, Lazzarino G, Di Pierro D, Nuutinen EM, Giardina B. Exogenous fructose-1,6-bisphosphate is a metabolizable substrate for the isolated normoxic rat heart. *Basic Res Cardiol*. 1992 May-Jun;87(3):280-9.
158. Cardenas A, Hurtado O, Leza JC, Lorenzo P, Bartrons R, Lizasoain I, et al. Fructose-1,6-bisphosphate inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase caused by oxygen-glucose deprivation through the inhibition of glutamate release in rat forebrain slices. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2000 Sep;362(3):208-12.
159. Cavallini L, Deana R, Francesconi MA, Alexandre A. Fructose-1,6-diphosphate inhibits platelet activation. *Biochem Pharmacol*. 1992 Apr 1;43(7):1539-44.
160. Oyanagui Y. Fructose-1,6-diphosphate enhanced oxyradicals and nitric oxide-dependent suppressions by dexamethasone of ischemic and histamine paw edema of mice. *Life Sci*. 1998;62(15):PL241-9.
161. Cuesta E, Boada J, Calafell R, Perales JC, Roig T, Bermudez J. Fructose 1,6-bisphosphate prevented endotoxemia, macrophage activation, and liver injury induced by D-galactosamine in rats. *Crit Care Med*. 2006 Mar;34(3):807-14.

162. Nunes FG, CM; Filho, JCFA; Lunardelli, A; Caberlon, E; Peres, A; De Oliveira, JR. Immunomodulatory effect of fructose-1,6-bisphosphate on T-lymphocytes. *International Immunopharmacology*. 2003;3:267-72.
163. Nunes FB, Alves-Filho JC, Alves Bastos CM, Tessele PM, Caberlon E, Moreira KB, et al. Effect of the chlorpropamide and fructose-1,6-bisphosphate of soluble TNF receptor II levels. *Pharmacol Res*. 2004 May;49(5):449-53.
164. Nunes FB, Simoes Pires MG, Alves Filho JC, Wachter PH, Rodrigues De Oliveira J. Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose 1,6-bisphosphate as cellular protection. *Crit Care Med*. 2002 Sep;30(9):2069-74.
165. Nunes FB, Graziottin CM, Alves Filho JC, Lunardelli A, Pires MG, Wachter PH, et al. An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. *Pharmacol Res*. 2003 Jan;47(1):35-41.
166. Alves Filho JC, Santos RC, Castaman TA, de Oliveira JR. Anti-inflammatory effects of fructose-1,6-bisphosphate on carrageenan-induced pleurisy in rat. *Pharmacol Res*. 2004 Mar;49(3):245-8.
167. Nunes FB, Gaspareto PB, Santos RC, de Assis M, Graziottin CM, Biolchi V, et al. Intravenous toxicity of fructose-1,6-bisphosphate in rats. *Toxicol Lett*. 2003 Jun 5;143(1):73-81.
168. *Guidelines on the Care and Use of Animals for Scientific Purposes*: Blackwell Science; 2004.

## OBJETIVOS

### 1. Objetivos Gerais

Avaliar o efeito da FBP na coagulação sanguínea e na agregação plaquetária em modelo experimental de sepse.

### 2. Objetivos Específicos

- 2.1. Avaliar os efeitos da FBP sobre a trombocitopenia;
- 2.2. Avaliar os efeitos da FBP sobre a agregação plaquetária *in vitro* e *ex vivo*;
- 2.3. Avaliar os efeitos da FBP sobre a coagulação sanguínea nas vias extrínseca, intrínseca e comum final.

## LOCAL DE EXECUÇÃO

Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob coordenação do Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira.

## ASPECTOS ÉTICOS

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul em 12 de dezembro de 2005, sob número 1190/05.

Os animais foram manipulados de acordo com as recomendações do “*Guidelines on the Care and Use of Animals for Scientific Purposes*”(168) aprovado pelo Conselho da Sociedade de Fisiologia Americana.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra ( $n=9/\text{grupo}$ ) foi calculado para um  $-P\alpha = 0,05$  e poder estatístico de 90%. As variáveis foram analisadas com o teste de Kolmogorov-Smirnov e classificadas como simétricas. Os dados, descritos como média $\pm$ desvio-padrão foram comparados por ANOVA e aplicado o pós teste de Bonferroni. A análise estatística foi realizada utilizando o pacote estatístico SPSS<sup>®</sup> versão 13.0 para Windows. Os gráficos foram construídos com auxílio do programa Graph Pad Prism<sup>®</sup> versão 4.02.

## ARTIGO ORIGINAL

Artigo original em inglês submetido à revista Critical Care Medicine em 04 de julho de 2007.

Fructose-1,6-bisphosphate inhibits *in vitro* and *ex vivo* platelet aggregation induced by ADP and ameliorates coagulation alterations in experimental sepsis in rats.

<sup>1,3</sup> Oliveira, Luciana M; <sup>1</sup> Simões Pires, Melissa G; <sup>1</sup> Magrisso, Alessandra B; <sup>2</sup> Munhoz, Terezinha P; <sup>3</sup> Roesler, Rafael; <sup>1</sup> Oliveira, Jarbas R.

<sup>1</sup> Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Avenida Ipiranga 6681, 12C, sala 263. CEP 90619-900 - Porto Alegre - RS, Brazil

<sup>2</sup> Laboratório de Hematologia - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Avenida Ipiranga 6681, 12C, sala 153. CEP 90619-900 - Porto Alegre - RS, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Farmacologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Sarmiento Leite 500. CEP 90046-900 - Porto Alegre - RS, Brazil.

## ABSTRACT

*Introduction:* Sepsis is a systemic response to an infection that leads to a generalized inflammatory reaction. There is an intimate relationship between procoagulant and proinflammatory activities, and coagulation abnormalities are common in septic patients. Pharmaceutical studies have focused to the development of substances that act on coagulation abnormalities and on the link between coagulation and inflammation. Fructose-1,6-bisphosphate (FBP) is a high-energy glycolytic metabolite that in the past two decades has been shown therapeutic effects in great number of pathological situations, including sepsis.

*Objectives:* The aims of this study were to assess the effects of FBP on platelet aggregation *in vitro* and *ex vivo* in naive and septic rats and evaluate the use of FBP as a treatment for thrombocytopenia and coagulation abnormalities in abdominal sepsis in rat.

*Results:* FBP inhibited platelet aggregation ( $p < 0.001$ ) *in vitro* in naive rats from the smallest dose tested, 2.5mM, in a dose-dependent manner. The mean effective dose calculated was 10.6mM. The highest dose tested, 40mM, completely inhibited platelet aggregation ( $p < 0.001$ ) induced by ADP. Platelet aggregation in plasma from septic rats was inhibited only with higher doses of FBP, starting from 20mM ( $p < 0.001$ ). The calculated mean effective dose was 19.3mM. *Ex vivo* platelet aggregation in septic rats was significantly lower ( $p < 0.05$ ) than higid rats and the treatment with FBP, at the dose of 2g/kg, diminished the platelet aggregation at the extention of 27% ( $p < 0.001$ ), suggesting that FBP is a potent platelet aggregation inhibitor *in vivo*. Moreover, treatment with FBP 2g/kg prevented thrombocytopenia ( $p < 0.001$ ), prolongation of

prothrombin and partial thromboplastin time ( $p < 0.001$ ), but not fibrinogen, in septic rats.

*Conclusions:* The most important findings in this study are that FBP is a potent platelet aggregation inhibitor, *in vitro* and *ex vivo*. It presents protective effects on coagulation abnormalities, which can represent a treatment against DIC. The mechanisms for these effects remain under investigation.

**Key words:** fructose-1,6-bisphosphate, sepsis, platelet aggregation, coagulation, blood.

## INTRODUCTION

Sepsis is a great challenge in medicine, affecting approximately 700.000 people annually in United States and accounting for about 210.000 deaths per year. It represents a major burden to the US health care system, with costs estimated to be about \$16.7 billion per year (1). In sepsis, a systemic response to an infection through endogenous mediators leads to a generalized inflammatory reaction in several organs remote from the initial insult and, eventually, to organ dysfunction or failure (2). Many investigators have reported the intimate relationship between procoagulant and proinflammatory activities (3). Coagulation abnormalities are a common occurrence in critically ill patients and have been associated with increased mortality (4). Almost every patient with sepsis presents abnormalities in the coagulation system, ranging from a small decrease in platelet count and subclinical prolongation of clotting times to full-blown disseminated intravascular coagulation (DIC). In the routine clinical setting, DIC is diagnosed on the basis of the platelet count dropping or low and prolongation of global clotting time tests (PT, aPTT). There is evidence that DIC is involved in the pathogenesis of microvascular dysfunction and contributes to organ failure. Also, activation of the coagulation system may cause bleeding, through the depletion of platelets and consumption of coagulation factors (5).

Supportive strategies that act on the coagulation system have been found to be beneficial in experimental studies and clinical trials. Pharmaceutical studies have focused in the development of substances that act on the link between coagulation and inflammation, such as antithrombin concentrate (6) or recombinant human activated protein C (rhapC) (7). FBP is a high-energy glycolytic metabolite that in the past two decades has been showing therapeutic effects in a great number of experimental injury

situations, and its benefic effects of FBP are documented in several organs and tissues (8-11). It is an activator of glycolitic route (12), an inhibitor of nitric oxide synthesis for inducible nitric oxide sintase (iNOS) (13), augments of fagocytosis (14), chelates extracellular calcium (15) and diminishes lipidic peroxidation and generation of oxygen reactive species (16). Studies have reported the protective effects of FBP in experimental sepsis and other inflammatory conditions. Nunes et al have demonstrated that FBP reduces the mortality rate provoked by experimental sepsis and ameliorates hematological and histological alterations (17), has anti-inflammatory properties, but not antimicrobial action (18) and acts as a powerful immunomodulatory agent, through inhibition of T-lymphocytes proliferation *in vitro* (19, 20); in pleurisy induced by carrageenan in rats, administration of 500mg/kg attenuated inflammatory parameters such as exudate volume, total leukocytes and the number of polymorphonuclear leukocytes (21).

The effects of this bisphosphorylated sugar have been attributed to its ability to maintain the levels of ATP when the cell is under stress. However, the cellular mechanisms involved in this action are still unclear. The aims of this experimental study were to assess the effects of FBP on platelet aggregation *in vitro* in plasma from septic rats and to test the effects of FBP treatment on thrombocytopenia and coagulation abnormalities caused by abdominal sepsis in rat.

## 1. MATERIAL AND METHODS

### 1.1. Subjects:

Male, Wistar rats, subject to a 12 h/12 h light/dark cycle in an acclimatized room, receiving water and regular food for rodents *ad libitum* and weighing 200-250 g were used. The animals were divided into three groups of 9 animals each: a control group, a septic group and a septic group that was treated with FBP. The sample size (n=9/group) was calculated to  $P\alpha=0.05$  and power of 90%.

### 1.2. Ethics:

This study was approved by the local ethics council. The care and the use of the animals were performed according to the “Guiding Principles in the Care and Use of Animals for Scientific Purposes” approved by the Council of the American Physiological Society .

### 1.3. Interventions:

Sepsis was induced according to Nunes et al, 2000 (22). The animals were anesthetized with ethyl ether and the abdomens were shaved and cleaned with iodide solution. A 1-cm incision was made above the linea alba and the cecum was exteriorized. Three perforations were performed with the point of a small surgery scissor, until faeces flow out, to ensure patency. The cecum was replaced in the abdominal cavity and the abdomen was sutured to close the abdominal wall and the skin

and again cleaned with iodine solution. For the treated group, sepsis was induced following the same procedure described above, and immediately after sepsis induction the rat was treated with 2g/kg of FBP (Sigma Chemical Co.) diluted in sterile saline solution until 1mL volume, *via* intraperitoneum. The control group was constituted of naive animals, which have not been submitted to any procedure. After the chirurgic procedure, each animal was placed in an individual cage for recovery, with food and water *ad libitum*, and was kept alone in the cage for twelve hours. After this period, blood was collected for analysis.

#### 1.4. Blood collection:

Twelve hours after sepsis induction, the animals were anesthetized with ethyl ether and blood was collected from the heart through direct puncture, approximately 6mL in syringes with heparin (Sigma Chemical Co), for platelet aggregation tests and approximately 2 mL in syringes with sodium citrate 1:9 (Sigma Chemical Co), for blood coagulation tests. After blood collection, the animals were euthanized by decapitation.

#### 1.5. Sample Preparation:

Blood collected with heparin was used in platelet aggregation tests. Sample was prepared according to Yun-Choi, 2000(23). Blood was centrifuged in (Centrifuge<sup>®</sup> 5804R, Eppendorf) for 15 minutes, at 24°C temperature and at 200G, to obtain the platelet rich plasma (PRP), which was separated in a clean glass tube. After, the remained blood was once more centrifuged for 15 minutes, at 24°C temperature and at 2000G, to obtain the platelet poor plasma (PPP). A platelet count was performed in the PRP and it was

adjusted to  $300 \times 10^3$  platelets/mL, by dilution with PPP, obtaining the platelet equalized plasma (PEP).

Blood collected with sodium citrate was analyzed in a blood counter (Coulter® T890, USA) to obtain platelet count. After this evaluation, blood was centrifuged for 15 minutes, at 24°C and 2000G and the plasma obtained was used for coagulation tests (PT, ATTP and fibrinogen).

## 1.6. Platelet Aggregation Test:

### 1.6.1. *In vitro*:

For *in vitro* platelet aggregation, Born (1962) technique was performed (24). For control tests, 800µL of PEP from naive or septic rats and 100µL of sterile physiologic solution were added in a plastic spectrophotometer cuvette and read in a spectrophotometer (Spectronic®, Genesis™) at 609 nm wave length. After, 100µL of adenosine diphosphate 0.2 mM (ADP, Sigma Chemical Co) was added to the cuvette, which was placed in a 37°C bath and kept under constant stirring for 5 minutes. After a two minutes rest, the cuvette was again read at 609 nm, and the aggregation was calculated in percentage according to Weiss formula (25).

To evaluate the effects of fructose-1,6-bisphosphate *in vitro*, the same test was performed, but instead of the addition of 100µL of sterile physiologic solution, 100µL of FBP diluted in sterile physiologic solution at concentrations of 25mM, 50mM, 100mM, 200mM and 400mM were used to obtain a dose-response curve. Note that the final concentrations of FBP in the tests were 2.5mM, 5mM, 10mM, 20mM and 40mM.

### 1.6.2. *Ex vivo*:

For *ex vivo* platelet aggregation, higid, septic and treated animals PEP were used. The test was performed similarly to the *in vitro* test, except that 900µL of PEP without the addition of any other solution, except ADP. The remained procedures were carried out as previously described, and the effect of sepsis and the treatment with FBP in rats was obtained.

## 1.7. Blood Coagulation Tests:

### 1.7.1. Prothrombin Time:

Prothrombin Time (PT) test was performed using the commercial kit Soluplastin<sup>®</sup>, provided by Wiener lab., Argentina. Briefly, 100µL of plasma kept in bath at 37°C temperature is added to 200µL of a solution containing brain rabbit thromboplastin, 0,0125mol/L of calcium chloride and 0,1mol/L of calcium sodium. The time elapsed between the addition of plasma and clot formation is counted with a chronometer. All samples were taken in duplicate.

### 1.7.2. Activated Partial Thromboplastin Time:

Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) test was performed using the commercial kit APTTest<sup>®</sup>, provided by Wiener lab., Argentina. For this test, 100µL of plasma and 100µL of cefalin are kept in bath at 37°C temperature for three minutes, in the same tube. After that, 100µL of calcium chloride 0,025mol/L is added to the solution and the time for the clot formation is counted. All samples were taken in duplicate.

### 1.7.3. Fibrinogen:

Fibrinogen test was performed through the commercial kit Fibrinógeno<sup>®</sup>, provided by Wiener lab., Argentina. For this test, 40µL of plasma is mixed with 360µL of imidazole buffer 0.05M and kept in bath at 37°C temperature. After two minutes, 200µL of plasma solution is added to 100µL of reconstituted thrombin (100 UNIH/mL) and the time for the clot formation is counted. All samples were taken in duplicate.

### 1.8. Statistical analysis:

The results are expressed as mean±standard deviation (SD). Multiple group comparisons were performed through ANOVA followed by *post hoc* Bonferroni, using the statistical package SPSS<sup>®</sup> 13.0 for Windows. P<0.05 was considered statistically significant.

## 2. Results:

### 2.1. Platelet Aggregation and platelet count:

#### 2.1.1. *In vitro*:

##### 2.1.1.1. Naive rats:

Platelet aggregation in control group was 91.9%. Fructose-1,6-bisphosphate inhibited platelet aggregation *in vitro* in naive rats from the smallest dose tested, 2.5mM, in a dose-dependent manner. The mean effective dose calculated is 10.6mM. It is important to emphasize that each dose tested presented statistic significance when compared to the control and one another. The highest dose tested, 40 mM, inhibited

completely platelet aggregation induced by ADP 0.2mM. The effect of FBP on platelet aggregation in plasma obtained from higid rats is seen on Figure 1.

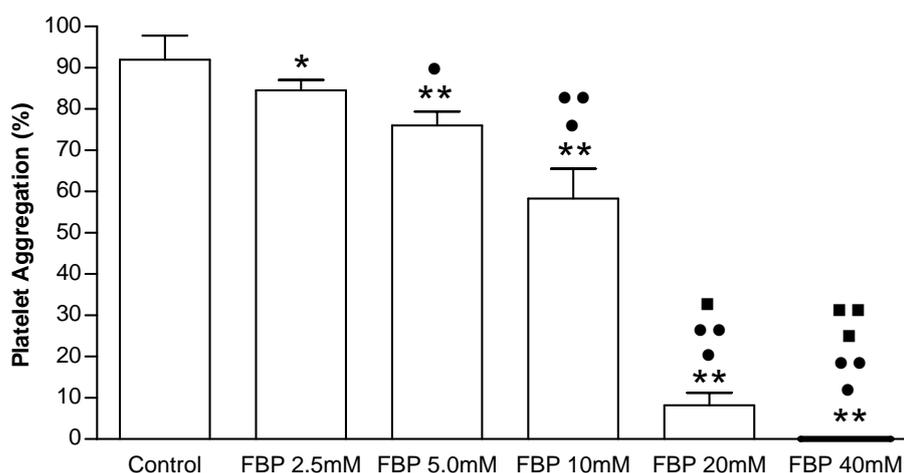


Figure 1: *In vitro* platelet aggregation in plasma obtained from naive rats and the inhibitory effects of increasingly higher doses of fructose-1,6-bisphosphate (FBP). Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical differences are represented as: \*  $P < 0.05$ , compared to control group; \*\*  $P < 0.001$ , compared to control group; •  $P < 0.007$ , compared to FBP 2.5mM group; ••  $P < 0.001$ , compared to FBP 5.0 mM group; □  $P < 0.001$ , compared to FBP 10mM group; □□  $P < 0.05$ , compared to FBP 20 mM group.

#### 2.1.1.2. Septic rats:

Differently from plasma from naive rats, platelet aggregation *in vitro* in septic rats was 78.3%, lower than higid animals (Figure 2). Moreover, platelet aggregation was inhibited only by higher doses of FBP, starting from 20mM. The calculated mean effective dose was 19.3mM. Platelet aggregation in plasma incubated with FBP at doses of 2.5 mM, 5.0 mM and 10mM were not different from the control group. The lowest

dose to inhibited platelet aggregation was 20mM, and the dose of 40mM inhibited platelet aggregation induced by ADP at rates of 2.65%.

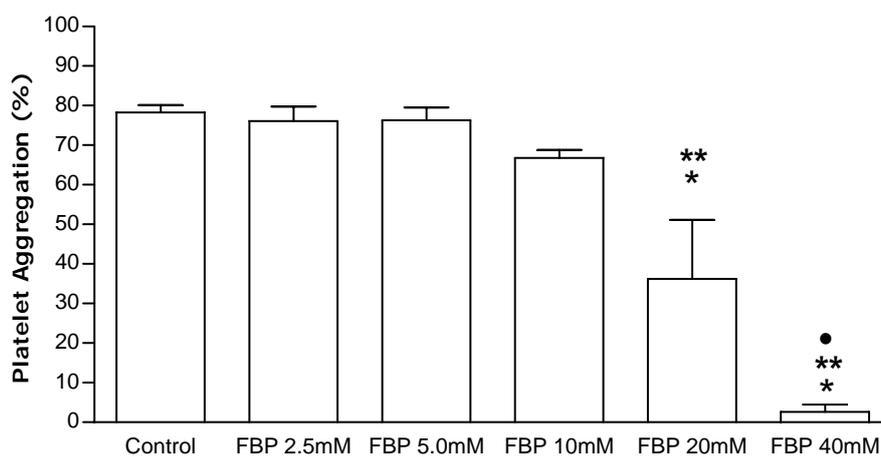


Figure 2: *In vitro* platelet aggregation in septic rats and the effects of increasingly higher doses of fructose-1,6-bisphosphate (FBP). Data are expressed as mean and standard deviation. Statistical differences are represented as: \*  $P < 0.001$ , compared to other groups; \*\*  $P < 0.001$ , compared to FBP 2.5mM, 5mM and 10mM; ●  $P < 0.001$ , compared to FBP 20mM group.

### 2.1.2. *Ex vivo*:

Platelet aggregation in septic rats was significantly lower than naive rats (Figure 3). Treatment with FBP, at the dose of 2g/kg, diminished the platelet aggregation at the extent of 27%, suggesting that FBP could be a potent platelet aggregation inhibitor *in vivo*.

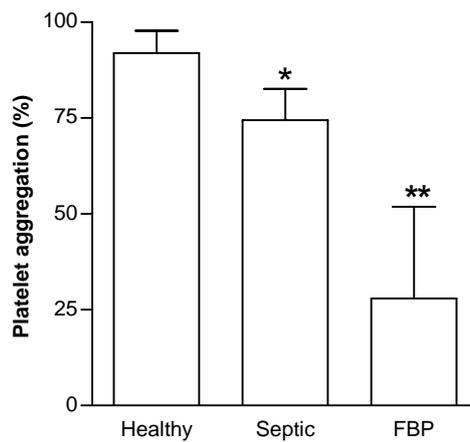


Figure 3: Platelet aggregation in rats twelve hours after the administration of fructose-1,6-bisphosphate (FBP), 2g/kg. Data are expressed as mean and standard deviation. Statistical differences are represented as: \* P<0.05, compared to naive group; \*\* P<0.001, compared to higid and septic group.

### 2.1.3. Platelet Count:

Treatment with FBP 2g/kg prevented thrombocytopenia in septic rats (Figure 4). As expected, platelet count in the septic group was significantly lower compared to naive group. The mean platelet number in the group treated with FPB was  $717 \times 10^3/\text{mL}$ , similar to higid group, not presenting statistic significance when compared.

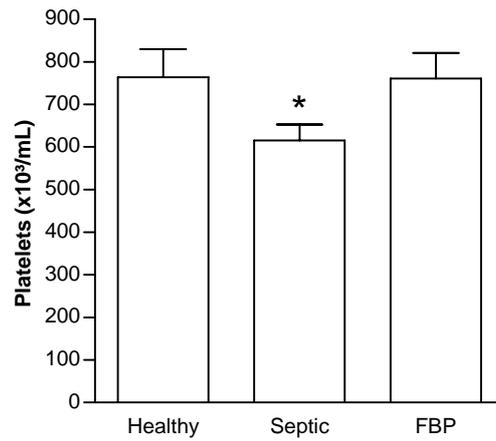


Figure 4: Platelet number in rats and the effects of the administration of fructose-1,6-bisphosphate (FBP), 2g/kg. Data are expressed as mean and standard deviation. Statistical difference are represented as: \*  $P < 0.001$ , compared to higid and FBP group.

## 2.2. Blood Coagulation:

### 2.2.1. Prothrombin time (PT):

Prothrombin time was increased in septic group, which is an indication of DIC. Treatment with FBP prevented the prolongation of PT (Figure 5).

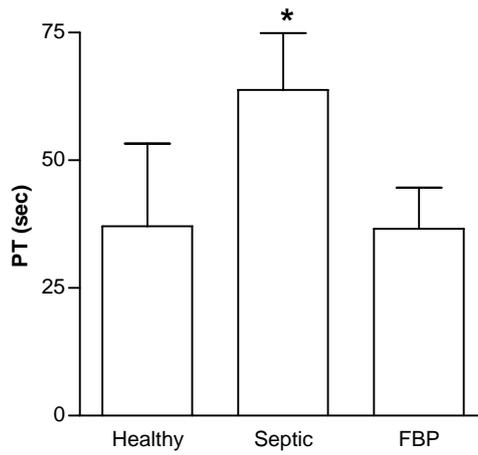


Figure 5: Prothrombin time (PT) in rats and the effects of the administration of fructose-1,6-bisphosphate (FBP), 2g/kg . Data are expressed as mean and standard deviation. Statistical difference is represented as: \*  $P < 0.001$ , compared to the naive and FBP group.

### 2.2.2. Activated partial thromboplastin time (APTT):

As occurred to prothrombin time, activated partial thromboplastin time was increased in septic group. FBP prevented the prolongation of APTT (Figure 6).

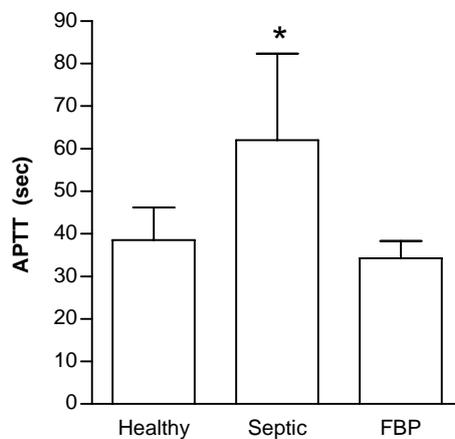


Figure 6: Activated partial thromboplastin time (APTT) in rats and the effects of the administration of fructose-1,6-bisphosphate (FBP), 2g/kg. Data are expressed as mean and standard deviation. Statistical difference is represented as: \*  $P < 0.001$ , compared to the naive group and the FBP group.

### 2.2.3. Fibrinogen:

Fibrinogen was increased in septic group when compared to higid control group, and also in the treated group. Differently from verified with prothrombin time and activated partial thromboplastin time, which were increased in septic group but in normal levels in the group treated with 2g/kg of FBP, fibrinogen was increased not only in septic group but also in the treated group (Figure 7).

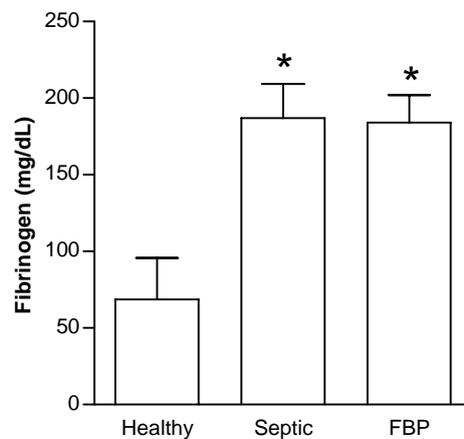


Figure 7: Fibrinogen levels in rats and the effects of the administration of fructose-1,6-bisphosphate (FBP), 2g/kg. Data are expressed as mean and standard deviation. Statistical differences are represented as: \*  $P < 0.001$ , compared to higid group.

### 3. Discussion and Conclusion:

#### 3.1. *In vitro* and *ex vivo* platelet aggregation, and platelet count:

The frequent occurrence of thrombocytopenia has been used as an early but nonspecific marker of sepsis. Mavrommatis et al (2000) have reported that platelet count were not changed in uncomplicated sepsis, but in severe sepsis and in septic shock platelet count was markedly reduced (26). It has been suggested that platelet count is a very important criteria to assess the hematological failure in septic process (27). Our study demonstrates that FBP is capable to inhibit platelet aggregation *in vitro* (Figures 1 and 2) and *ex vivo* (Figure 3). *In vitro*, FBP is an inhibitor of platelet aggregation induced by ADP 0.2mM from the smallest dose tested, 2.5mM; even though a higher dose of FBP is required to inhibit platelet aggregation *in vitro* in sepsis, from doses starting at 20mM the inhibition is at rates of 36%. Therefore, the mean effective dose was different in the two groups. This phenomenon can be explained through the fact that in sepsis platelets are over stimulated, thus a higher dose of FBP is needed to inhibit platelet aggregation (28). The results suggest that FBP is a potent inhibitor of platelet aggregation induced by ADP in experimental sepsis. This effect is not due to a diminishing in the platelet count in the treated group; the number of platelets in treated rats was did not present statistic significance when compared to the naive group (Figure 4), which is, it has normal platelet count.

Stimulation of platelets by ADP leads to a transient increase in intracellular calcium due to both rapid calcium influx and mobilization of internal stores and simultaneously to inhibition of adenylyl cyclase contributing to platelet aggregation (29). One study have shown the ability of FBP to chelar ionic calcium (30), and this could be a possible mechanism of action against platelet aggregation. Cavallini et al. (1992) have demonstrated that FBP inhibits *in vitro* platelet aggregation induced by

several agonists, including ADP. In this work they also reported that thrombin-promoted ATP secretion and cytosolic calcium rise are also drastically inhibited by FBP, which decreases the protein kinase C-dependent phosphorylation. Further they observed that FDP does not affect platelet activation induced by the protein kinase C activators. Their results indicate that FDP inhibits platelet activation at a level preceding phospholipase C and these authors suggested that the antiaggregatory action of FBP occurs at the cellular surface, most likely by interfering with the transmission of signal at level of the receptor-G protein-phospholipase C system (31).

### 3.2. Coagulation:

The mechanisms involved in the pathological coagulation disorder in septic patients have become increasingly clear recently. Inflammation, tissue injury, and organ dysfunction are driven by a cascade of proinflammatory cytokines. Proinflammatory cytokines act at various sites in hemostasis control, turning to a procoagulant state. (2, 4, 32) and have great importance in sepsis, being responsible for expression of tissue factor (TF). TF is a potent platelet aggregator and coagulation cascade activator. In sepsis, activation of the extrinsic coagulation pathway by TF induces increased coagulation, activating factor VII of the extrinsic pathway, which indirectly amplifies the thrombin production, itself is a proinflammatory mediator (4, 33, 34). In addition, activation of coagulation in sepsis can occur indirectly through the activation of intrinsic pathway by bacterial products, such as lipid A and lipoteichoic acid (gram-negative product and gram-positive product, respectively) (35).

Inhibition of the fibrinolytic system is another key element of the pathogenesis of fibrin deposition during severe inflammation. Although the initial response in sepsis is

an increase in fibrinolytic activation, mediated by the immediate release of plasminogen activators, this response is only short-lived and rapidly shut-off by a great increase in the main inhibitor of fibrinolysis, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). TNF- $\alpha$  and IL-1 can increase PAI-1 synthesis or release from endothelium and decrease plasminogen activator synthesis (5).

In the present study, we verified the effects of treatment with FBP over prothrombin time, activated partial thromboplastin time and fibrinogen levels in sepsis. Even though PT and aPTT are not very useful to detect activation of blood coagulation, these are the tests commonly used in daily practice. We verified that prothrombin time, activated partial thromboplastin time and fibrinogen levels are increased in the septic group, a possible reflex of DIC, together with thrombocytopenia. FBP prevented the prolongation of prothrombin time and activated partial thromboplastin time, which means that FBP acts on the coagulopathy generated by sepsis. Protective effects on fibrinogen increase were not verified. Further studies are needed to assess the mechanisms which FBP acts on the coagulation system.

#### 4. Final considerations:

In conclusion, the most important findings in this study are that FBP is a potent platelet aggregation inhibitor, *in vitro* and *ex vivo*. Moreover, it presented protective effects on coagulation abnormalities, such as thrombocytopenia, TP and APTT, which can represent a treatment against DIC. The mechanisms for these effects remain under investigation. Thus, we suggest that after more studies FBP may represent a new approach in the sepsis treatment like as Activated Protein C, modulating both inflammatory and coagulation systems.

## 5. Conflict of interest statement:

All authors disclose that there were no financial, personal, or their relationships with other people or organizations within three years of beginning the work submitted that could inappropriately influence the work submitted.

## 6. References:

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001 Jul;29(7):1303-10.
2. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. 1997 Jul;112(1):235-43.
3. Marshall JC. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med*. 2001 Jul;29(7 Suppl):S99-106.
4. Jagneaux T, Taylor DE, Kantrow SP. Coagulation in sepsis. *Am J Med Sci*. 2004 Oct;328(4):196-204.
5. Levi M, de Jonge E, van der Poll T. Sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Thrombolysis*. 2003 Aug-Oct;16(1-2):43-7.
6. Wiedermann CJ, Hoffmann JN, Juers M, Ostermann H, Kienast J, Briegel J, et al. High-dose antithrombin III in the treatment of severe sepsis in patients with a high risk of death: efficacy and safety. *Crit Care Med*. 2006 Feb;34(2):285-92.
7. Vincent JL, Bernard GR, Beale R, Doig C, Putensen C, Dhainaut JF, et al. Drotrecogin alfa (activated) treatment in severe sepsis from the global open-label trial ENHANCE: further evidence for survival and safety and implications for early treatment. *Crit Care Med*. 2005 Oct;33(10):2266-77.
8. Takeuchi K, Cao-Danh H, Friehs I, Glynn P, D'Agostino D, Simplaceanu E, et al. Administration of fructose 1,6-diphosphate during early reperfusion significantly improves

recovery of contractile function in the postischemic heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998 Aug;116(2):335-43.

9. Sun JX, Farias LA, Markov AK. Fructose 1-6 diphosphate prevents intestinal ischemic reperfusion injury and death in rats. *Gastroenterology.* 1990 Jan;98(1):117-26.

10. De Oliveira JR, Rosa JL, Ambrosio S, Bartrons R. Effect of galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism: protective role of fructose 1,6-bisphosphate. *Hepatology.* 1992 Jun;15(6):1147-53.

11. Cuesta E, Boada J, Calafell R, Perales JC, Roig T, Bermudez J. Fructose 1,6-bisphosphate prevented endotoxemia, macrophage activation, and liver injury induced by D-galactosamine in rats. *Crit Care Med.* 2006 Mar;34(3):807-14.

12. Ehringer WD, Chiang B, Chien S. The uptake and metabolism of fructose-1,6-diphosphate in rat cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem.* 2001 May;221(1-2):33-40.

13. Edde L, Zhou X, Eaton JW, Sherman MP. Induction of nitric oxide synthase in macrophages: inhibition by fructose-1,6-diphosphate. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Feb 24;243(3):683-7.

14. Markov AK, Oglethorpe N, Terry J, Grogan JB, Hellems HK. Stimulating effect of fructose 1-6 diphosphate on the phagocytic function of rat RES and on human leukocyte carbohydrate metabolism. *Am J Med Sci.* 1985 Jul;290(1):3-10.

15. Hutcheson AE, Rao MR, Olinde KD, Markov AK. Myocardial toxicity of cyclosporin A: inhibition of calcium ATPase and nitric oxide synthase activities and attenuation by fructose-1,6-diphosphate in vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1995 Jul;89(1):17-26.

16. Cardenas A, Hurtado O, Leza JC, Lorenzo P, Bartrons R, Lizasoain I, et al. Fructose-1,6-bisphosphate inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase caused by oxygen-glucose deprivation through the inhibition of glutamate release in rat forebrain slices. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000 Sep;362(3):208-12.

17. Nunes FB, Simoes Pires MG, Alves Filho JC, Wachter PH, Rodrigues De Oliveira J. Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose 1,6-bisphosphate as cellular protection. *Crit Care Med.* 2002 Sep;30(9):2069-74.

18. Nunes FB, Graziottin CM, Alves Filho JC, Lunardelli A, Pires MG, Wachter PH, et al. An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. *Pharmacol Res.* 2003 Jan;47(1):35-41.

19. Nunes FB, Alves-Filho JC, Alves Bastos CM, Tessele PM, Caberlon E, Moreira KB, et al. Effect of the chlorpropamide and fructose-1,6-bisphosphate of soluble TNF receptor II levels. *Pharmacol Res.* 2004 May;49(5):449-53.
20. Nunes FG, CM; Filho, JCFA; Lunardelli, A; Caberlon, E; Peres, A; De Oliveira, JR. Immunomodulatory effect of fructose-1,6-bisphosphate on T-lymphocytes. *International Immunopharmacology.* 2003;3:267-72.
21. Alves Filho JC, Santos RC, Castaman TA, de Oliveira JR. Anti-inflammatory effects of fructose-1,6-bisphosphate on carrageenan-induced pleurisy in rat. *Pharmacol Res.* 2004 Mar;49(3):245-8.
22. Nunes F, Oliveira, JR, Pires, MGS, Wächter, PH. Septic Induction in rats (Wistar): Experimental model. *Revista de Medicina da PUCRS.* 2000;10:183-7.
23. Yun-Choi HS, Park KM, Pyo MK. Epinephrine induced platelet aggregation in rat platelet-rich plasma. *Thromb Res.* 2000 Dec 15;100(6):511-8.
24. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature.* 1962 Jun 9;194:927-9.
25. Weiss HJ, Rogers J. Thrombocytopenia due to abnormalities in platelet release reaction-studies on six unrelated patients. *Blood.* 1972 Feb;39(2):187-96.
26. Mavrommatis AC, Theodoridis T, Orfanidou A, Roussos C, Christopoulou-Kokkinou V, Zakynthinos S. Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit Care Med.* 2000 Feb;28(2):451-7.
27. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* 1996 Jul;22(7):707-10.
28. Levi M. Platelets in sepsis. *Hematology.* 2005;10 Suppl 1:129-31.
29. Hechler B, Leon C, Vial C, Vigne P, Frelin C, Cazenave JP, et al. The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood.* 1998 Jul 1;92(1):152-9.
30. Nunes FB, Gaspareto PB, Santos RC, de Assis M, Graziottin CM, Biolchi V, et al. Intravenous toxicity of fructose-1,6-bisphosphate in rats. *Toxicol Lett.* 2003 Jun 5;143(1):73-81.

31. Cavallini L, Deana R, Francesconi MA, Alexandre A. Fructose-1,6-diphosphate inhibits platelet activation. *Biochem Pharmacol.* 1992 Apr 1;43(7):1539-44.
32. Opal SM. Interactions between coagulation and inflammation. *Scand J Infect Dis.* 2003;35(9):545-54.
33. Amaral A, Opal SM, Vincent JL. Coagulation in sepsis. *Intensive Care Med.* 2004 Jun;30(6):1032-40.
34. Mammen EF. The haematological manifestations of sepsis. *J Antimicrob Chemother.* 1998 Jan;41 Suppl A:17-24.
35. Dellinger RP. Inflammation and coagulation: implications for the septic patient. *Clin Infect Dis.* 2003 May 15;36(10):1259-65.

## ANEXOS

### A. COMPROVANTE DE ENVIO À REVISTA



**Fructose-1,6-bisphosphate inhibits in vitro and ex vivo platelet aggregation induced by ADP and ameliorates coagulation alterations in experimental sepsis in rats.**

Journal:	<i>Critical Care Medicine</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Original Articles - Laboratory Investigations
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Oliveira, Luciana; Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Laboratory of Cellular Biophysics and Inflammation Simões Pires, Melissa Guerra; Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Laboratory of Cellular Biophysics and Inflammation Magrisso, Alessandra Bileski; Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Laboratory of Cellular Biophysics and Inflammation Munhoz, Terezinha Paz; Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Laboratory of Hematology Roesler, Rafael; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Laboratory of Pharmacology Oliveira, Jarbas Rodrigues de; Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Laboratory of Cellular Biophysics and Inflammation
Key Words:	fructose-1,6-bisphosphate, sepsis, platelet aggregation, coagulation, blood



## B. NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÕES E TESES

A Comissão de Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da FAMED/UFRGS, de acordo com a Resolução 12/2007 do Conselho De Ensino, Pesquisa e Extensão e Resolução 93/2007 da Câmara de Pós-Graduação, resolve estabelecer as seguintes normas para apresentação de dissertações e teses no PPG Medicina: Ciências Médicas:

1. As Dissertações de Mestrado e as Teses de Doutorado deverão obrigatoriamente conter pelo menos um artigo científico redigido em língua inglesa segundo normas internacionais.
2. As Dissertações de Mestrado e as Teses de Doutorado deverão obrigatoriamente conter revisão de literatura em língua portuguesa, redigida de forma a contemplar todos os aspectos sumariamente revisados na introdução do artigo científico.
3. Com os componentes obrigatórios definidos acima e seus respectivos complementos, a forma final das Dissertações e Teses deverá constar de:

- Resumo
- Introdução
- Revisão da literatura
- Objetivos

- Referências da revisão da literatura
- Pelo menos um artigo científico redigido em inglês (apresentado de acordo com as normas da revista ao qual está submetido ou publicado)
- Anexos

### Formato final da Dissertação ou Tese

#### 1. Capa dura em cor verde esmeralda com as seguintes informações:

Nome da instituição, descrito no terço superior:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Título da Dissertação ou Tese, descrito no terço médio

Nome do autor

Nome do orientador ou orientadores

Especificação, no terço inferior, de Dissertação de Mestrado ou Tese de  
Doutorado

Ano

2. Lombada: a partir do terço superior devem constar as seguintes informações:  
Dissertação de Mestrado ou Tese de Doutorado, ano, autor. As informações deverão ser redigidas em tipo Arial, estilo normal, tamanho 14, em dourado.
3. Folha de rosto: repete as informações da capa.
4. Ficha catalográfica: descrita no verso da folha de rosto terço inferior.
5. Agradecimentos e dedicatórias
6. Corpo da tese ou dissertação constando de:
  - Resumo
  - Introdução
  - Revisão da literatura
  - Objetivos
  - Referências da revisão da literatura
  - Pelo menos um artigo científico redigido em inglês
  - Anexos
7. Anexos: questionários, escalas, instrumentos de coleta de dados, etc.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Avaliação dos efeitos da frutose-1,6-bisfosfato sobre a agregação plaquetária  
e a coagulação sanguínea na sepse experimental em ratos.

Autora: Luciana Mello de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Dissertação de Mestrado

2007