

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA - CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO EXPERIMENTAL PARA AVALIAR O
MECANISMO PROTETOR DA
FRUTOSE 1,6 BISFOSFATO NO
TRATAMENTO DA SEPSE**

Fernanda Bordignon Nunes

Orientador: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Tese de Doutorado

2003

*Aos meus pais, meu orientador,
minha equipe de trabalho, a todos
meus amigos, com carinho.
Obrigada pelo incentivo, dedicação,
paciência, idéias e amor!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira pela credibilidade, incentivo, exemplo de vida e pesquisa, profissionalismo e pela paciência durante a execução deste trabalho.

Ao curso de Pós graduação em Medicina – Ciências Médicas da UFRGS, representado pela Profª Drª Sandra Fuchs, pela oportunidade de aprimoramento científico dentro dos mais elevados padrões exigidos pelo curso.

À Diretora da Faculdade de Biociências da PUCRS, Clarice Prade Carvalho, pela amizade, incentivo e apoio na realização desse trabalho.

As secretárias dos cursos de pós-graduação em Ciências Médicas da UFRGS e Biociências da PUCRS: Letícia, Luciano, Débora, Helena, Luíza e Jô.

Aos meus amigos do Laboratório de Pesquisa em Biofísica da PUCRS: Adroaldo, Roberto, Daiane, Aline, Cristine, Silvana, Vanderlei (Vavá), José (Bento), Elisiane, Denizar, Isabel, Telmo, Patrick, Paula, Márcio, Fernando (Spiller), Leandro (Spineli), Maria Helena e Rafael.

A turma da cultura: Eduardo, Karla, Paola e Vanessa, obrigada pelo trabalho minucioso, exaustivo... e pelas horas consumidas sem descanso e alimentação.

Um agradecimento muito especial pelas horas não dormidas, pela paciência, pelo mau humor, pelo carinho e dedicação das amigas Taísa e Rossana...VALEU!

Aos meus amigos muito especiais Carol, Cássio e José Carlos (Zeca) pela parceria, apoio em todos os momentos da realização desse trabalho e por serem meu esqueleto apendicular em todos os sentidos.

Aos meus amigos e colegas de trabalho Alan, Anamaria, Ana Cristina, Paulo e Cinara, obrigada pelo apoio e incentivo.

À minha amiga e irmã Melissa, obrigada pelos conselhos, dedicação, carinho e suporte nos momentos difíceis.

À todos os meus amigos farmacêuticos e biólogos que tiveram companheirismo e paciência para suportar minhas angústias ao longo da realização desse trabalho, em especial Jorge, Luis Alberto, Gisele, Luís Felipe, Andressa, Tiago, Glauco, Guto, Alice, Aline, Tais, Viviane, Cristiano, Felipe, Ana, Kelli, Luis Pedro (Pepe), Glauco, Juliano e Alessandra.

À todos os voluntários...obrigada pelo sangue doado nessa pesquisa!

Aos biólogos José Arthur Chies, Alessandra Peres, Moisés Bauer e Nance Nardi, obrigada pelo empréstimo de materiais de consumo, espaço físico, receptividade, idéias e colaboração na realização desse trabalho.

Ao professor Luiz Glock pelo incentivo e apoio.

Aos laboratórios de Microbiologia do Hospital São Lucas e PUCRS, Prof. Rodrigues, Ricardo e Geneci.

Ao laboratório de Parasitologia, Prof. De Carli e Tiana, obrigada pelo apoio.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desta tese.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
ARTIGO 1.....	9
ARTIGO 2.....	9
ARTIGO 3.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
REVISÃO DE LITERATURA.....	11
ARTIGO 1.....	11
1- INTRODUÇÃO.....	14
2-REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1. SEPSE.....	17
2.1.2. TOXINAS BACTERIANAS.....	18
2.1.3. IMUNOPATOGENICIDADE DAS BACTÉRIAS.....	19
2.2. PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	22
2.2.1. VALORES HEMATOLÓGICOS RELACIONADOS COM A SEPSE E PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	26
2.3.COAGULAÇÃO INTRAVASCULAR DISSEMINADA.....	27
2.4. DÉFICIT DE ENERGIA CELULAR NA SEPSE.....	29
2.5. TRATAMENTO NA SEPSE.....	30
2.5.1. ANTIBIOTICOTERAPIA.....	31
2.5.2. IMUNOTERAPIA.....	32
2.5.3. AÇÃO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO.....	33
2.5.3.1. FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO COMO UM REGULADOR DO METABOLISMO.....	33
2.5.3.1.1. EFEITOS SOBRE AS ENZIMAS DA GLICÓLISE.....	33
2.5.3.1.2. EFEITO SOBRE AS ENZIMAS GLICONEOGÊNICAS.....	35
2.5.3.2. EFEITO PROTETOR DA FBP.....	36
2.5.3.2.1. EFEITO SOBRE A ISQUEMIA CARDÍACA.....	36
2.5.3.2.2. EFEITO SOBRE ERITRÓCITOS.....	38
2.5.3.2.3. PROTEÇÃO DA LESÃO RENAL PROVOCADA PELA ISQUEMIA.....	39
2.5.3.2.4. PROTEÇÃO CONTRA A FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES.....	40
2.5.3.2.5. AÇÃO PROTETORA DA FBP SOBRE ISQUEMIA EM CÉREBRO E ASTRÓCITOS....	41
2.5.3.2.6. PROTEÇÃO CONTRA AÇÃO DE DROGAS.....	42
2.5.3.2.7. EFEITO PROTETOR NA SEPSE POR <i>ESCHERICHIA COLI</i>	44

2.5.3.2.8. PODER ANTIINFLAMATÓRIO DA FBP.....	44
3 - OBJETIVOS.....	45
OBJETIVO GERAL.....	45
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	46
AN ASSESSMENT OF FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATE AS NA ANTIMICROBIAL AND ANTI- INFLAMMATORY AGENT IN SEPSIS.....	56
ABSTRACT.....	56
INTRODUCTION.....	56
MATERIAL AND METHODOS.....	57
RESULTS.....	58
DISCUSSION.....	60
REFERENCES.....	61
AVALIAÇÃO DA FRUTOSE 1,6-BISFOSFATO COMO AGENTE ANTIMICROBIANO E ANTIINFLAMATÓRIO NA SEPSE.....	63
RESUMO.....	63
INTRODUÇÃO.....	64
MATERIAL E MÉTODOS.....	65
RESULTADOS.....	69
DISCUSSÃO.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
IMMUNOMODULATORY EFFECT OF FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATE ON T LYMPHOCYTES.....	80
ABSTRACT.....	80
INTRODUCTION.....	80
MATERIAL AND METHODOS.....	81
RESULTS.....	83
DISCUSSION.....	83
REFERENCES.....	84
EFEITO IMUNOMODULATÓRIO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO EM LINFÓCITOS T.....	86
RESUMO.....	86
1. INTRODUÇÃO.....	87
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	89
3. RESULTADOS.....	91
4. DISCUSSÃO.....	94
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
EFFECT OF THE CHLORPROPAMIDE AND FRUCTOSE 1,6 BISPHOSPHATE ON SOLUBLE TNF RECEPTORII LEVELS.....	104

SUMMARY.....	105
INTRODUCTION.....	106
MATERIAL AND METHODS.....	108
RESULTS.....	110
DISCUSSION.....	111
REFERENCES.....	114
EFEITO DA CLORPROPAMIDA E FRUTOSE 1,6 BISFOSFATO EM NÍVEIS DE RECEPTORES SOLÚVEIS TIPO II DE TNF.....	120
RESUMO.....	121
INTRODUÇÃO.....	122
MATERIAL E MÉTODOS.....	124
RESULTADOS.....	126
DISCUSSÃO.....	127
REFERÊNCIAS.....	130
5 - CONCLUSÕES.....	137
6 - PERSPECTIVAS FUTURAS.....	138
ANEXOS.....	139

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTH-** Hormônio adrenocorticotrófico
- ALT-** Alanina aminotransferase
- AMP-** Adenosina monofosfato
- AST-** Aspartato aminotransferase
- ATP-** Adenosina trifosfato
- C (n°)-** Complemento
- CI4-** Tetracloreto de carbono
- CIVD-** Coagulação Intravascular Disseminada
- DNA –** Ácido Desoxirribonucléico
- EGTA-** Etilenoglicol-bis-(β-aminoetil eter)
- FBP-** Frutose-1,6-bisfosfato
- H(n°)-** Histamina
- IFN-** Interferon
- IL-** Interleucina
- iNOS-** Óxido nítrico sintetase induzida
- LPS-** Lipopolissacarídeo
- LTB4-** Leucotrieno B4
- NAD-** Nicotidina Adenina Dinucleotídeo
- NADH-** Nicotidina Adenina Dinucleotídeo forma reduzida
- NK-** Natural Killer
- PAF-** Fator ativador de plaquetas
- PFK-** Fosfofrutoquinase
- PVC-** Pressão venosa central
- SARA-** Síndrome da angústia respiratória no adulto
- TNF (FNT)-** Fator de necrose tumoral

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1. Representação esquemática da Alfa-D-frutose-1,6-bisfosfato.....33

ARTIGO 1

FIGURA 1. Percentual de hemoculturas positivas nos grupos experimentais.....58 e 69

FIGURA 2. Cultura de *E. coli* após incubação de 24 horas. (a) água destilada, ausência de inibição; (b) frutose-1,6-bisfosfato, ausência de inibição (c) ampicilina 10 µg, visível halo de inibição.....59 e 70

FIGURA 3. Médias e desvios padrões dos valores de leucócitos nos grupos. As diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e os grupos séptico e Frutose-1,6-bisfosfato são indicadas por * ($P < 0,05$) e, entre o grupo séptico e o da Frutose-1,6-bisfosfato, são indicadas por ♦ ($P < 0,05$).....59 e 70

FIGURA 4. Médias e desvios padrões dos valores de bastonados nos grupos experimentais. As diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e os grupos séptico e Frutose-1,6-bisfosfato são indicadas por ** ($P < 0,01$) e, entre o grupo séptico e o da Frutose-1,6-bisfosfato, são indicadas por ♦♦ ($P < 0,01$).....59 e 71

FIGURA 5. Médias e desvios padrões dos valores de monócitos nos grupos experimentais. As diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e o grupo séptico é indicado por ** ($P < 0,01$) e, entre o grupo séptico e o da Frutose-1,6-bisfosfato são indicadas por ♦ ($P < 0,05$). Não houve diferenças significativas entre o grupo controle e o da Frutose-1,6-bisfosfato.....60 e 72

ARTIGO 2

FIGURA 1. O efeito Imunomodulatório da frutose-1,6-bifosfato em linfócitos T estimulados com PHA. Os PBMCs foram estimulados por 96 h com PHA, e com várias concentrações de FBP. A proliferação foi medida usando o ensaio colorimétrico de MTT. Os resultados são apresentados com uma densidade ótica de significância \pm DP e todas reações foram executadas em quadruplicata. O asterisco demonstra uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle PHA (estimulado).....82 e 92

FIGURA 2. O efeito de Citotoxicidade da Frutose-1,6-bifosfato em PBMCs. Os PBMCs foram incubados por 24h com várias concentrações de FBP. A viabilidade celular foi verificada pelo método de exclusão do Trypan blue. Todos os testes foram executados em quadruplicata.....82 e 93

FIGURA 3. Os níveis de receptores solúveis de IL-2 na presença de Frutose-1,6-bifosfato. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 96h depois do ensaio de limfoproliferação. Os receptores solúveis de IL-2 foram medidos pelo método de Enzima Imuno Ensaio (ELISA). Os resultados foram expressos com uma significância \pm D.P. O asterisco demonstra uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle PHA (estimulado).....83 e 94

ARTIGO 3

FIGURA 1. Efeito imunomodulador da clorpropamida e Frutose-1,6-bisfosfato em linfócitos-T estimulados com PHA. As células mononucleares foram estimuladas durante 96h com PHA e concentrações variadas de clorpropamida e FBP. A proliferação foi verificada utilizando-se o ensaio colorimétrico de MTT. Os resultados foram aferidos por densidade óptica com média \pm EP de culturas em quadruplicata. O asterisco demonstra diferença significativa ($P < 0,05$) com relação ao grupo estimulado com PHA.....117 e 134

FIGURA 2. Efeito citotóxico da clorpropamida e Frutose-1,6-bisfosfato em células mononucleares. As células mononucleares foram incubadas durante 96h com concentrações variadas de clorpropamida e FBP. A viabilidade celular foi verificada pelo método de exclusão trypan blue. Os resultados são apresentados em porcentagem com média \pm EP de culturas em quadruplicata. Os asteriscos demonstram diferença significativa ($P < 0,05$) com relação ao grupo controle.....118 e 135

FIGURA 3. Níveis dos receptores solúveis de FNT tipo II (sFNTRII) em presença de clorpropamida e Frutose-1,6-bisfosfato. Os sobrenadantes da cultura foram coletados após 24 h de estimulação com LPS. sFNTRII foi determinado por ELISA. Os resultados são expressos com média \pm D.P. Os asteriscos demonstram diferença significativa ($P < 0,05$) com relação ao grupo estimulado com LPS.....119 e 136

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

TABELA I - A Frutose-1,6-bisfosfato e as enzimas da glicólise.....	34
TABELA II - Efeito da FBP sobre as enzimas da gliconeogênese.....	35
TABELA III - Efeito protetor da FBP em ratos tratados com galactosamina.....	43

ARTIGO 1

TABELA 01 – Efeito antiinflamatório da Frutose-1,6-bisfosfato em edema de pata de rato induzido por carragenina.....	59 e 71
TABELA 02 – Efeito da Frutose-1,6-bisfosfato e EGTA sobre a concentração de cálcio iônico em solução.....	60 e 72

1- INTRODUÇÃO

A sepse é decorrente da invasão de um grande número de microorganismos ou suas toxinas na circulação sanguínea (1). As alterações hemodinâmicas que ocorrem durante o curso clínico do choque séptico se devem às endotoxinas (LPS) liberadas pelas bactérias gram-negativas, que desencadeiam a cascata dos mediadores inflamatórios, resultando em distúrbios da microcirculação em muitos órgãos (2). Ocorre então, o aporte insuficiente de oxigênio para os tecidos acarretando no predomínio da glicólise anaeróbica nos tecidos, com aumento de ácido láctico e dano celular (3). Estudos específicos em músculo esquelético, cardíaco e no fígado de seres humanos e animais têm mostrado a depressão da respiração mitocondrial por endotoxinas *in vivo* e *in vitro* (4).

No processo séptico há um aumento significativo nas interleucinas. Após a inoculação de endotoxina, certas citocinas aparecem rapidamente na circulação sanguínea. A seqüência clássica é a liberação do fator de necrose tumoral (FNT- α), seguido das interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6) e 8 (IL-8) (5) que são chamadas de citocinas pró-inflamatórias. A administração endovenosa de citocinas (FNT- α , IL-1, IL-2) induz uma síndrome semelhante à sepse ou choque séptico em animais ou voluntários humanos (6). Vários estudos correlacionam os níveis séricos das citocinas com as alterações clínicas e a gravidade da doença em pacientes sépticos afim de identificar os pacientes que possam se beneficiar da administração de moduladores antiinflamatórios (7). A IL-2 é promotora da mitogênese dos Linfócitos T, sendo portanto, uma citocina pró-inflamatória. Pacientes tratados com IL-2, tiveram o aumento de FNT- α no sangue (8) e hipotensão associada com o aumento da permeabilidade vascular, decorrente da liberação de óxido nítrico, uma vez que o bloqueador da síntese desse neurotransmissor, pelo N-metil-L-arginina, reverte este efeito (9).

Além da IL-2, a ativação ou desativação de canais iônicos, podem estar envolvidos na proliferação de Linfócitos T. Uma variedade de canais de cálcio são identificados em diferentes tipos de células, alguns dos quais, são voltagem dependentes (10,11). A mudança (aumento) no potencial elétrico transmembrana está relacionada com o crescimento e divisão celular. Utilizando-se um mitógeno (fitohemaglutinina) verifica-se que há um aumento do cálcio iônico extracelular, que pode provocar hiperpolarização celular (12) por aumentar o efluxo de potássio. Essas mudanças no potencial elétrico da membrana estão intimamente relacionadas a mitogênese de linfócitos T (13).

Apesar dos avanços terapêuticos, a sepse continua sendo uma das causas mais comuns de mortalidade (30 a 50%) nas unidades de terapia intensiva quando associada à disfunção de múltiplos órgãos. A resposta imune descontrolada parece ser a principal causa dessa patologia, sendo que um dos maiores desafios da imunologia é controlar as respostas indesejadas e estimular as desejadas.

Um candidato promissor para essa terapia na sepse é a Frutose-1,6-bisfosfato (FBP), um produto intermediário de alta energia da rota glicolítica. Em recente estudo, nosso grupo constatou o efeito protetor da FBP no tratamento da sepse em animais (14). A droga aumentou o tempo de sobrevivência em 80% dos animais quando comparados ao grupo séptico, onde 100% dos animais chegavam ao óbito em um período de 15 horas. Dois tipos básicos de mecanismos são propostos para explicar o mecanismo protetor da FBP. O primeiro é que ela poderia, dentro da célula, modular o metabolismo glicolítico para aumentar os níveis de ATP (15,16,17,18). A segunda proposta é que a FBP atuaria em receptores de membrana ou fora da célula, quelando e reduzindo o cálcio iônico e a recaptção de cálcio pelas células (19). Isso justifica-se pelo fato que a molécula é altamente carregada, tendo dificuldades em entrar na célula.

A relação entre o efeito protetor da FBP frente a lesões celulares e as modificações produzidas nos fluxos metabólicos e na permeabilidade da membrana ao potássio foi estudada em hepatócitos de ratos. A incubação dessas células com a FBP reduz a atividade metabólica, não afetando na concentração de ATP, o que sugere simplesmente uma manutenção no ciclo do ATP. Em hepatócitos incubados com FBP o fluxo passivo e ativo de potássio é reduzido. Entretanto, a bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em membranas semipurificadas não foram diretamente afetadas pela presença de FBP, o que sugere uma redução da atividade da bomba secundariamente induzida pela FBP. Além disso, as células tratadas com galactosamina, mostraram um aumento na permeabilidade ao potássio, que foi abolida pela presença desse metabólito. O efeito protetor, pode estar relacionado a prevenção ao efluxo de potássio (20).

Para que essa droga possa futuramente ser utilizada de forma segura no tratamento da sepse em ensaios clínicos, o presente estudo avaliou a ação da Frutose-1,6-bisfosfato sobre o sistema imune, dando ênfase ao seu efeito *in vitro* e *in vivo* no processo infeccioso e inflamatório.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1. SEPSE

A sepse é uma síndrome clínica, secundária à invasão da corrente sanguínea por um grande número de microorganismos tais como bactérias (pirogênicas ou não), fungos, parasitas e vírus ou suas toxinas (21).

Seus fatores fisiopatológicos incluem, principalmente, o local da infecção, sendo os sistemas da coagulação, fibrinolítico e inflamatório os determinantes de sua evolução (21).

Os principais sintomas da sepse são a febre, pulso arritmico e a pressão arterial baixa em virtude da queda na resistência periférica, aumento da capacidade vascular e conseqüentes variações no débito cardíaco que, mesmo quando normal ou alto, mostra-se insuficiente. Além destes sintomas, pode ocorrer diarreia, anúria, resfriamento das extremidades, pressão venosa central (PVC) baixa, insuficiência pulmonar progressiva, acidose metabólica, retenção nitrogenada (22,4), hemorragia digestiva e sangramentos anormais (21).

A vasodilatação periférica é o mecanismo básico do choque endotóxico sendo que alguns órgãos são particularmente comprometidos pelo choque. No coração distinguem-se dois grupos de lesões: as necroses e hemorragias subendocárdicas e subepicárdicas e as lesões zonais ou em faixa do miocárdio. A necrose vai desde lesões isquêmicas de fibras miocárdicas isoladas a áreas de micro e macroinfartos (23).

Os pulmões são resistentes à isquemia e, portanto, são pouco lesados no choque hipovolêmico puro, mas são constantemente lesados na sepse, constituindo o chamado “pulmão de choque”, equivalente à “Síndrome de Angústia Respiratória do Adulto” (SARA). O quadro se caracteriza por acentuado edema intra-septal, seguido de coleção de líquido de

edema e exsudato proteico nos espaços alveolares, além da presença ocasional de membranas hialinas (2).

Nos rins as lesões se localizam nos túbulos de todos os níveis. O padrão mais característico é o da necrose tubular aguda. Nas supra-renais ocorrem alterações comuns a todos os tipos de estresse, tais como exaustão lipídica e necrose das células corticais a partir da zona reticular. Podem ocorrer necrose e hemorragia na mucosa do tubo digestivo, designadas de gastroenteropatia hemorrágica. Nos casos mais graves podem ser observadas necrose centrolobular no fígado e esteatose. As lesões cerebrais variam com a sensibilidade das células atingidas, constituindo o conjunto na encefalopatia hipóxica (24).

2.1.1. TOXINAS BACTERIANAS

Sob o nome de toxinas bacterianas compreendem-se dois grupos de substâncias: exotoxinas e endotoxinas.

As alterações hemodinâmicas que ocorrem durante o curso clínico do choque séptico se devem às endotoxinas liberadas das paredes celulares das bactérias gram negativas e as exotoxinas produzidas por bactérias gram positivas que causam dano tecidual (22).

Nas bactérias gram negativas, a endotoxina parece ser fator crucial na patogenicidade do choque séptico. São parte integrante da parede celular microbiana e tipicamente são lipopolissacarídeos (LPS) compostos de uma porção lipídica (lipídio A) inserida na parede celular, um núcleo polissacarídico evolutivamente conservado e o polissacarídeo O, altamente variável e responsável pela diversidade destas moléculas detectadas sorologicamente (25). As endotoxinas são normalmente liberadas quando a célula morre, desencadeando a cascata dos

mediadores inflamatórios, aumentando a permeabilidade capilar e vasodilatação, resultando em distúrbios da microcirculação em muitos órgãos (2).

Na circulação, a endotoxina ativa o centro termorregulador e o processo de coagulação, altera o sistema Calicreína/Bradicinina, atrai leucócitos para o local da inflamação acarretando na queda do tônus esfíncteriano da microcirculação e dilatação de capilares e vênulas. Ocorre, então, o aporte insuficiente de oxigênio para os tecidos acarretando o predomínio da glicólise anaeróbica nos tecidos, com aumento de ácido láctico (acidose láctica) e dano celular. O fluxo sanguíneo deficiente nos tecidos impede a retirada normal do dióxido de carbono, que reage localmente nas células com a água, formando concentrações intracelulares muito elevadas de ácido carbônico. Este, por sua vez, reage com diversos tampões teciduais para formar outras substâncias intracelulares ácidas. Durante o estresse sistêmico aumenta a produção de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico). Para cada molécula de ACTH produzida, observamos uma molécula de endorfina, acarretando não só analgesia potente como também hipotensão e alta permeabilidade vascular (21).

A maioria das exotoxinas são proteínas secretadas pela célula bacteriana. Em alguns casos estas toxinas consistem de duas ou mais subunidades, uma das quais é requisito para ligação e penetração na célula, enquanto a outra inibe ou ativa algumas funções celulares (25).

Freqüentemente as toxinas (endotoxinas e exotoxinas) fazem parte da estratégia de entrada, propagação ou defesa contra o hospedeiro (25).

2.1.2. IMUNOPATOGENICIDADE DAS BACTÉRIAS

O sistema imunológico é efetivamente uma barreira contra a infecção e a agressão causada por agentes patogênicos. Quando linfócitos T ou B específicos ao antígeno estão

ausentes ocorrem conseqüentemente complicações infecciosas. Em certas circunstâncias, entretanto, os próprios mecanismos imunológicos contribuem para a instalação de processos patológicos (22).

Uma função importante da resposta imune é recrutar mais células fagocitárias e moléculas efetoras para o local da infecção, através da liberação de uma bateria de citocinas e de outros mediadores inflamatórios. As citocinas cuja síntese é estimulada quando os macrófagos reconhecem constituintes microbianos são as monocinas. As monocinas compreendem um grupo estruturalmente diferenciado de moléculas e incluem a interleucina-1, a interleucina-6, a interleucina-8, a interleucina-12 e o FNT- α (Fator de Necrose Tumoral α). O FNT- α é um indutor da resposta inflamatória local que ajuda a conter as infecções e que também demonstra efeitos sistêmicos, muitos dos quais são prejudiciais. IL-1, IL-6 e FNT- α executam um papel crítico na indução da resposta de fase aguda no fígado. IL-1 e IL-6 induzem febre, o que favorece a defesa do hospedeiro de vários modos. IL-8 é importante na migração de neutrófilos aos locais da infecção e a IL-12 é uma citocina significativa na ativação das células NK (Natural Killers) e no desvio de uma resposta de célula T CD4⁺, face à diferenciação de células T inflamatórias (22). Os efeitos combinados desses mediadores contribuem para as reações locais contra a infecção na forma de uma resposta inflamatória.

O LPS estimula uma gama extraordinária de respostas do hospedeiro. Os efeitos clínicos mais importantes são febre e colapso vascular ou choque. A febre pode beneficiar o hospedeiro ou o parasita, ou ambos, e atualmente considera-se que a febre é decorrente da ação da interleucina 1 (IL 1) e o fator de necrose tumoral (FNT- α) no hipotálamo, ambos produzidos por macrófagos em resposta ao LPS (26).

Atualmente a citocina mais intimamente relacionada à sepse é o FNT- α . Foi demonstrado que níveis séricos elevados de FNT- α estão correlacionados com a gravidade das doenças, pois é o principal mediador dos efeitos fisiopatológicos da endotoxemia e choque endotóxico e contribui para a estimulação da síntese do óxido nítrico pela indução da enzima óxido nítrico sintase nos tecidos (27). No entanto, experimentos com animais indicam que nestes casos o FNT- α provavelmente sinergiza com outras citocinas como IL-1 e IFN- γ para produzir toda a amplitude de efeitos (25).

A liberação do FNT- α pelos macrófagos induz efeitos locais protetores, mas quando liberado sistemicamente pode ter efeitos prejudiciais. O FNT- α atua nos vasos sanguíneos, especialmente vênulas, aumentando o fluxo de sangue, a permeabilidade face a líquidos, proteínas e células, e a adesividade para as células brancas e plaquetas. A liberação local permite, assim, um influxo de líquidos, proteínas e de células para o tecido infectado, com participação na defesa do hospedeiro. Mais tarde os pequenos vasos se fecham, prevenindo a disseminação da infecção para o sangue, os fluidos e células são drenadas para os linfonodos regionais onde se inicia a resposta imune adaptativa. Quando existe uma infecção sistêmica o resultado é o choque, coagulação intravascular disseminada com depleção dos fatores de coagulação e conseqüentes hemorragias, falência múltipla de órgãos e a morte (26).

A ativação do complemento pelos agentes de infecção contribui com a atividade dos mediadores inflamatórios C5a (o mais potente), C3a e C4a (em menor grau). Sendo intrinsecamente um mediador inflamatório, C5a é capaz, também, de ativar os mastócitos, levando-os à liberação de seus conteúdos granulares, que incluem a histamina, a serotonina e

leucotrieno B4 (LTB4) que contribuem para as alterações ocorridas nas células endoteliais nos locais de infecção (26).

Freqüentemente a consequência biológica da associação das moléculas do complemento, anticorpos e endotoxina é a lise celular. A via clássica se inicia pela ativação do componente C1 pelo complexo antígeno-anticorpo, havendo, portanto a necessidade de uma resposta imune estabelecida que garanta a pré-existência deste complexo. O C1 promove a clivagem de C4 em C4a e C4b. O componente C1 também vai agir sobre C2 dando origem aos fragmentos C2a e C2b, formando um complexo C4b2 que é denominado C3 convertase. Este último converte C3 em C3a e C3b. A ativação dos demais componentes (C5 e C9) se dá pela ação simultânea de C4b2 e C3b, resultando em um complexo decamolecular composto por uma molécula de C5b, uma C6, uma C7, uma de C8 e seis de C9 denominado complexo de ataque à membrana celular. A lise promovida pelo sistema complemento se inicia pela fixação de C5b à receptores na membrana da célula alvo, e é potencializada pelos componentes restantes (C6 a C9) (28).

Uma via alternativa se inicia a partir do componente C3, que pode ser ativado pelas endotoxinas. Tais mediadores conjugam-se para produzir uma permeabilidade capilar exagerada, que inicia a fase hipovolêmica do processo séptico (22).

2.2. PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é a reação local dos tecidos à agressão, como por exemplo à bacteremia, ocorrendo como resposta inespecífica que se caracteriza por uma série de alterações que tende a minimizar ou mesmo neutralizar os efeitos da agressão. As inflamações agudas se caracterizam pelo predomínio de fenômenos exsudativos decorrentes de alterações na permeabilidade vascular permitindo o acúmulo de líquido (edema) na região inflamada, de

fibrina (formada no interstício celular pela interação entre componentes do plasma e fatores teciduais), de leucócitos, especialmente neutrófilos, e de hemácias. Nas inflamações crônicas, além destes elementos, ocorre localmente a proliferação de vasos, fibroblastos (com conseqüente deposição de colágeno), como também migração e proliferação local de monócitos e linfócitos (2).

A primeira alteração que se observa é uma fugaz vasoconstrição arterial local, que logo é seguida por dilatação ativa e intensa das arteríolas, capilares e veias circundantes. Os esfínteres pré-capilares relaxam e, como conseqüência, numerosos capilares que estavam fechados, em repouso, se abrem aumentando significativamente o número de capilares funcionantes, tornando-se dilatados e ingurgitados. Após, há um aumento da permeabilidade dos capilares e vênulas. Estes vasos têm paredes muito finas, constituídas principalmente pelo endotélio, membrana basal e alguns pericitos. As células endoteliais e os pericitos contêm em seu citoplasma actina e miosina, sendo, por esta razão, contráteis. Por usarem contração, podem modificar as junções intercelulares, ampliando-as. Na inflamação ocorre um aumento da permeabilidade capilar; como conseqüência da ação de substâncias farmacologicamente ativas (os mediadores) que se formam no local. Os endotélios e pericitos se contraem separando as junções intercelulares permitindo a passagem sucessiva de líquido, macromoléculas e eventualmente, de células do sangue para o interstício. Em certos tipos de inflamação, os próprios agentes endotóxicos são capazes de lesar os vasos, permitindo que grandes quantidades de fluido, macromoléculas e células se acumulem nos interstícios. Como conseqüência do aumento da permeabilidade vascular, ocorre aumento da concentração dos elementos figurados do sangue (hemoconcentração) aumentando a viscosidade sangüínea. Esta alteração aumenta o contato das células com o endotélio, facilitando a saída de fluido dos

vasos. Estes eventos provocam uma progressiva queda da velocidade da circulação e a área inflamada passa a ser mal oxigenada (29). O aumento da quantidade de líquidos nos interstícios eleva a drenagem linfática, o que pode ser benéfico por permitir que o agente agressor seja eliminado ou neutralizado, não obstante, pode servir também para disseminá-lo. O exsudato inflamatório é importante na contenção e limitação da agressão, pois dilui o agente agressor facilitando a sua retirada do local. Concomitantemente o exsudato transporta para o interstício anticorpos, complemento e outras macromoléculas envolvidas na inibição ou mesmo destruição de certos agressores, assim como na modulação da própria resposta inflamatória. O aumento da permeabilidade vascular associado à dilatação do leito capilar e venoso, além de outros fatores como o aumento da adesividade das plaquetas e a hemoconcentração, colaboram para um progressivo retardo da circulação na área inflamada, alterando o padrão da circulação. A migração das células da luz do vaso ao foco inflamatório não se faz de modo aleatório.

Os polimorfonucleares, especialmente os neutrófilos, são as células dominantes nas primeiras 24 a 48h após a invasão por microorganismos patogênicos. A seguir, começam a migrar os monócitos do sangue que ativados nos tecidos recebem a denominação de macrófagos; seguem-se os eosinófilos, e as células imunologicamente ativas como os linfócitos. As hemácias migram em menor número, porém, quando a agressão é muito grave, levando a comprometimento dos vasos, podem ser as células dominantes (2).

A adesão dos leucócitos está relacionada à carga iônica do endotélio e das células, assim como também ao cálcio (Ca^{++}). Tem sido descritas proteínas adesinas que são induzidas ou ativadas por mediadores químicos e participam da adesão celular. Algumas destas adesinas se encontram em vesículas do citoplasma e na superfície das células, podendo sofrer a ação de vários fatores quimiotáticos, de frações do complemento, como conseqüência aumentam a sua

quantidade, favorecendo a adesão. A interleucina 1 estimula a síntese de adesinas pelas células endoteliais sendo que algumas delas são específicas para alguns tipos de leucócitos. Por outro lado, outros mediadores parecem inibir a síntese de adesinas e desempenham papel nas fases de regressão do processo inflamatório (30).

O controle da intensidade da resposta inflamatória, assim como seu desencadeamento, é realizado por mediadores. A vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular são mediados pela histamina e pela serotonina. No ser humano, a histamina é armazenada em mastócitos, basófilos e plaquetas e a serotonina em plaquetas, porém nos roedores, a serotonina é estocada em mastócitos. A liberação de histamina no foco inflamatório pode ser desencadeada por injúria tecidual, complexo antígeno-anticorpo, sendo este anticorpo da classe IgE, e pelos componentes C3a e C5a do sistema de complemento. Estes fatores promovem a degranulação dos mastócitos e basófilos, com posterior liberação da histamina no meio extracelular (2).

A histamina exerce suas funções interagindo com receptores, que podem ser de três tipos: H1, H2 e H3. A interação com receptores do tipo H1 desencadeia aumento de permeabilidade vascular em vênulas pós-capilares. A ativação de receptores H2 inibe a quimiotaxia de leucócitos e estimula linfócitos T supressores. A estimulação concomitante de receptores H1 e H2 promove vasodilatação máxima. A interação com receptores H3 promove inibição da síntese de secreção de histamina (2).

As cininas são outras substâncias envolvidas no processo inflamatório. São hormônios peptídicos endógenos, com ações potentes sobre os vasos sanguíneos. Todas as cininas possuem ação biológica semelhante, pertencem ao grupo de vasodilatadores mais potentes conhecidos. Causam aumento do fluxo sanguíneo renal e produzem hipotensão quando

injetadas em animais. Aumentam também a permeabilidade capilar. A formação de cininas é catalisada pela ação de um grupo de peptidases chamadas calicreínas que agem sobre os cininogênios (uma α_2 -globulina plasmática). A geração de cininas no plasma é obtida pela seqüência de reações enzimáticas: ativação do fator Hageman, ativação pré-calicreína em calicreína e clivagem do cininogênio em cininas, usualmente a bradicinina. A ativação deste sistema enzimático durante a reação inflamatória promove aumento da permeabilidade vascular, uma vez que a bradicinina é um potente agente vasoativo, induzindo vasodilatação. A bradicinina e a calidina são polipeptídeos curtos que atuam como agentes hipotensores e atuam sobre o músculo liso sendo liberados de proteínas plasmáticas específicas. Eles (polipeptídeos) contêm somente aminoácidos de proteínas. A calicreína apresenta atividade quimiotática para neutrófilos. Todas as calicreínas são serina-proteases, sendo que os sítios ativos e mecanismos de ação assemelham-se aos de outras enzimas deste grupo. A calicreína plasmática está normalmente presente na forma de proenzima, a pré-calicreína, que é ativada pelo fator Hageman. Por sua vez, a calicreína constitui um potente ativador do fator Hageman e, portanto, faz parte do sistema de cascata da coagulação sangüínea (31).

O fator ativador de plaquetas (PAF) também participa da resposta inflamatória. É um fosfolípido de membrana produzido pelos mastócitos e por leucócitos. Durante a resposta inflamatória promove a ativação e agregação de plaquetas, aumento da permeabilidade vascular, influxo de neutrófilos polimorfonucleares e eosinófilos, ativação de fagócitos seguida da liberação de radicais livres, liberação de enzimas lisossomais e de produtos do metabolismo do ácido araquidônico e estimula a produção de interleucina-1 pelas células endoteliais (32).

2.2.1. VALORES HEMATOLÓGICOS DA SEPSE E DO PROCESSO INFLAMATÓRIO

A liberação da reserva granulocítica medular dos neutrófilos ocorre por estímulos humorais, oriundos de áreas inflamadas, infeccionadas, traumatizadas ou necróticas. Os agentes quimiotáticos como a interleucina 1 provêm dos monócitos/macrófagos, dos agentes infecciosos (oligopeptídeos bacterianos) ou dos linfócitos. A neutrocitose derivada da mobilização da reserva caracteriza-se por aumento dos bastonados, já que estes predominam na medula. Esta alteração hematológica é chamada comumente de desvio à esquerda, um indicador sensível e específico de infecção. Há neutrocitose nas meningites, nas pneumonias, nas peritonites, na sepse e, quando há coleções purulentas teciduais, intracavitárias ou serosas. Os cocos gram-positivos causam neutrocitose com mais constância, mas a infecção por gram-negativos pode igualmente acompanhar-se de neutrocitose. Na sepse há eosinocitopenia e linfocitopenia e os monócitos não se alteram nas primeiras horas. Tanto a linfocitopenia, quanto a eosinocitopenia podem ocorrer em situações de estresse de qualquer origem, ou em doenças infecciosas em geral (33).

2.3. COAGULAÇÃO INTRAVASCULAR DISSEMINADA

Na sepse pode ocorrer o desenvolvimento de microcoágulos em áreas difusas do corpo (coagulação intravascular disseminada - CIVD). A destruição dos glóbulos vermelhos, seja por parasitas ou mecanismos auto-imunes, libera fosfolípidos que aceleram a coagulação sanguínea culminando com a formação de trombina. Morfologicamente, o que é visto após a coagulação sanguínea são agregados de plaquetas com filamentos de fibrina na periferia. Na microscopia eletrônica observa-se, à medida que o processo evolui, plaquetas agregadas que apresentam-se degranuladas e de contornos irregulares. Sabe-se que as plaquetas são ricas em ATP e que possuem todos os elementos necessários para a respiração aeróbica. São elas, inclusive, capacitadas de realizar fagocitose (34).

Na coagulação intravascular disseminada (CIVD) ocorre a ativação difusa do sistema de coagulação, cuja consequência é uma profunda perturbação da hemostasia. As endotoxinas bacterianas podem desencadear este quadro, pois ativam o fator XII (Hageman), que é o primeiro fator do sistema de coagulação em sua via intrínseca. O fator XII é uma proteína globular (betaglobulina) encontrado no plasma na forma inativa, conhecida como pré-fator Hageman, não apresentando atividade enzimática. Sua ativação é o resultado de contato com macromoléculas como colágeno, complexos imunes e polissacarídeos das paredes bacterianas. Um segundo mecanismo de ativação envolve clivagem do fator Hageman através de enzimas proteolíticas como plasmina e calicreína. A ativação do sistema de coagulação pode ser desencadeada pelo fator Hageman ativado, o qual atua em um conjunto de enzimas plasmáticas denominadas tromboplastinas. Estas por sua vez convertem a protombina em trombina, que transforma o fibrinogênio em monômeros de fibrina, originando polímeros de fibrina. Durante a resposta inflamatória, a ativação desta via enzimática serve para circunscrever o agente agressor e, por consequência, a própria resposta inflamatória (2).

A CIVD não é apenas uma grave perturbação da hemostasia, mas constitui um mecanismo geral da doença. O sistema da coagulação tem a finalidade de manter o sangue dentro do compartimento vascular. O processo é desencadeado em duas etapas: uma fase inicial conhecida como hemostasia primária, que leva à produção do tampão plaquetário e uma segunda etapa, a coagulação propriamente dita, que leva à formação da fibrina provocando o selamento do tampão plaquetário. À medida que a cicatrização começa a se processar, a fibrina é gradualmente removida por um sistema enzimático denominado de sistema fibrinolítico. Um grande progresso no conhecimento da fisiopatologia da CIVD foi a demonstração da importância fundamental do sistema fibrinolítico no mecanismo de defesa. Embora a

coagulação seja controlada por uma série de agentes inibidores que têm a finalidade de delimitar sua ação ao local da lesão, em certas condições patológicas pode haver disseminação do processo com deposição intravascular de fibrina formada. O sangue circulante, nestas condições torna-se inteiramente anormal e o plasma passa a apresentar características mais de soro do que propriamente de plasma. A coagulação intravascular disseminada ataca não somente a fibrina formada como também o fibrinogênio. Este é fragmentado em produtos de degradação, denominados de X e Y (que possuem atividade antitrombina), e os “d” e “e” (que interferem na polimerização da fibrina). Ao que tudo indica, o mecanismo fibrinolítico não só impede a deposição de fibrina que eventualmente se forma, como também representa um dos mecanismos de defesa contra a disseminação da coagulação. Além da ação anticoagulante destes fragmentos do fibrinogênio há, por um mecanismo patológico especial, o desencadeamento sistêmico da coagulação, com formação de fibrina e sua deposição na microcirculação, condicionando grave perturbação da hemostasia por depleção de fatores plasmáticos pró-coagulantes e de plaquetas. Imediatamente é desencadeada a ativação do sistema fibrinolítico, com fibrinogénólise e formação de fragmentos de fibrinogênio com atividade anticoagulante sendo que muitos destes fenômenos são processados de modo simultâneo. Uma série de condições patológicas, inteiramente distintas entre si, pode desencadear o processo de coagulação intravascular disseminada. A melhor maneira de definir esta síndrome é como sendo uma condição caracterizada essencialmente pela ativação da protombina em trombina de um modo disseminado (2).

2.4. DÉFICIT DE ENERGIA CELULAR NA SEPSE

Estudos específicos em músculo esquelético, cardíaco e no fígado de seres humanos e animais têm mostrado a depressão da respiração mitocondrial por endotoxinas “*in vivo*” e “*in*

vitro". Eventualmente há desacoplamento da oxidação e respiração, significando que a energia produzida por oxidação de substratos não é incorporada pelos aceptores de fosfato. A utilização de oxigênio sem produção de ATP pode explicar o quadro clínico de déficit de energia, a despeito do alto consumo de O₂ (4).

Ocorre também a diminuição da enzima hepática triptofano pirrolase com correspondente diminuição da produção de ácido nicotínico que participa do sistema enzimático respiratório (4).

O déficit de energia no choque séptico e hemorrágico e a sua subsequente irreversibilidade têm sido correlacionados com a perda das bases Adenina e Guanina que participam da síntese dos fosfatos de alta energia (4). Com a falta de utilização de O₂ há queda da fosforilação oxidativa e conseqüente queda da concentração de ATP. O uso da glicólise anaeróbica aumenta o ácido láctico que induz a queda do pH. Por sua vez, a falta de ATP diminui a eficácia da bomba Na⁺/K⁺ e da ATPase transportadora de cálcio. O Na⁺ e o Ca⁺⁺ entram para o interior da célula e o K⁺ sai. A pequena quantidade de Ca⁺⁺ que é normalmente sequestrado na mitocôndria dispersa-se para o citosol. Com o aumento do gradiente osmótico no interior da célula, entra água no citoplasma se acumulando nas cisternas do RE e mitocôndria, inchando a célula. Com isto há dispersão dos polissomos, com diminuição da síntese protéica. Os lisossomos incham e em fase tardia liberam hidrolases que promovem a destruição dos constituintes celulares. Este mecanismo de degradação celular é potencializado pelo aumento da concentração citosólica de cálcio, que é responsável pela ativação de fosfolipases endógenas que vão degradar os fosfolípídeos das membranas (4).

No choque séptico ocorrem fenômenos que deprimem a produção de energia celular e, como consequência, dá-se a queda dos níveis energéticos. Esta queda pode provocar a morte celular (3).

2.5. TRATAMENTO NA SEPSE

Na guerra contra doenças bacterianas, os microorganismos têm-se mostrado em posição ostensiva. A medicina utiliza um arsenal de antibióticos na defesa contra bactérias, no entanto, a resistência bacteriana persiste. Organismos bacterianos que causam inúmeras patologias desenvolvem potentes mecanismos de resistência à drogas (35).

A gravidade da sepsé pode estar associada também ao uso indiscriminado e maciço de antibióticos os quais, em inadequadas dosagens e administrações, podem potencializar a ação de microorganismos (como as bactérias gram-negativas que são as principais desencadeadoras do processo séptico) (36). Os antibióticos são vítimas de sua própria força evolucionária quando usados em grande escala e seu uso indiscriminado seleciona bactérias que sobrevivem por criarem resistência à eles (25).

A resistência bacteriana aos antibióticos, cuja atividade pode ser bloqueada por enzimas de bactérias, codificadas por genes localizados no DNA citoplasmático em plasmídeos, pode estar relacionada com a capacidade das mesmas em transferir plasmídeos entre organismos individuais, significando que as cepas ou espécies previamente suscetíveis a determinado antibiótico podem adquirir a capacidade de produzir estas enzimas e assim adquirir resistência diretamente de organismos resistentes. Estas formas resistentes são selecionadas direcionalmente sob antibioticoterapia com os indivíduos suscetíveis sendo eliminados da população (25).

2.5.1 ANTIBIOTICOTERAPIA

Diferentes medicamentos são associados ao combate da microbiota relacionada a sepse, entre elas cabe destacar: a) Cefalosporinas: compreendem a Ceftiaxona, Cefotaxima e Ceftazidima consideradas de 3ª geração e Cefipima e Cefipiroma consideradas de 4ª geração, que apresentam vantagens com relação às de 3ª geração por apresentarem atividade satisfatória sobre enterobactérias e *Pseudomonas aeruginosa* (37). b) Carbapenêmicos: representados pelo Imipenem e Meropenem, seguem sendo os antibióticos de aspecto mais amplo disponível. Seu uso está restrito às infecções causadas por *Acinetobacter* sp. e por bacilos gram-positivos produtores de beta-lactamases. Tal cuidado na utilização desses fármacos deve-se a sua alta capacidade de indução de beta-lactamases e desenvolvimento de resistência, principalmente pela *Pseudomonas aeruginosa*, inclusive transtratamento com falhas terapêuticas documentadas (38).

Considerando que a precocidade no diagnóstico e a capacidade de adequação dos esquemas de tratamento empírico e peculiaridades de vários grupos de antibióticos disponíveis algumas unidades de tratamento intensivo adotaram a utilização de Cefalosporina de 4ª geração associada ou não a aminoglicosídeos como tratamento, quando passou a se observar em alguns casos a resistência da *Pseudomonas aeruginosa*. Apesar do estabelecimento de uma estratégia lógica, falhas terapêuticas poderão ocorrer obrigando à alteração do tratamento inicial. Em pelo menos um estudo publicado a abordagem antibiótica inicial teve que ser alterada por falha terapêutica em 36% dos casos (77 de 214 casos). Cabe ressaltar que a falha trata-se de uma resposta dos pacientes constatada através de parâmetros clínicos, laboratoriais e/ou radiológicos após 72h de antibioticoterapia (39).

2.5.2. *IMUNOTERAPIA*

Os estudos com agentes mediadores antiinflamatórios não-esteroidais, como o anticorpo monoclonal anti-FNT- α , antagonistas dos receptores solúveis de FNT- α , antagonistas solúveis de IL-1, antagonistas dos receptores da bradicinina e antagonistas das prostaglandinas não demonstraram eficácia na prática clínica (40).

Os glicocorticóides foram um dos primeiros agentes usados para modular a resposta inflamatória em pacientes com sepse (41). O primeiro estudo que avaliou o tratamento com baixas doses de glicocorticóides na sepse, dependente de vasopressor, receberam hidrocortizona 100 mg três vezes ao dia, via endovenosa durante cinco dias (42). Deve-se salientar que os pacientes do grupo que receberam glicocorticóides apresentaram apenas uma redução discreta na mortalidade ($p < 0,09$).

Briegel et al (1999), também estudaram o efeito de doses similares de hidrocortizona em pacientes com choque séptico hiperdinâmico (43). Os pacientes com sepse foram randomizados e receberam 100 mg de hidrocortizona iv em bolus, com seguimento de infusão contínua de 0,18 mg/Kg/hora por seis dias ou receberam as mesmas doses de placebo. Os pacientes tratados com hidrocortizona eram mais propensos à suspensão dos vasopressores do que os pacientes tratados com placebos ($p < 0,05$). Um estudo publicado na França sugere que pequenas doses de glicocorticóides podem reverter o choque séptico, dependente de vasopressores, como também melhorar a sobrevida (44).

2.5.3. *AÇÃO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO*

2.5.3.1. FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO COMO UM REGULADOR DO METABOLISMO

A frutose-1,6-bisfosfato (FBP) é um açúcar bisfosforilado que tem duas estruturas estáveis anoméricas, a α e a β furanosa (fig 1).

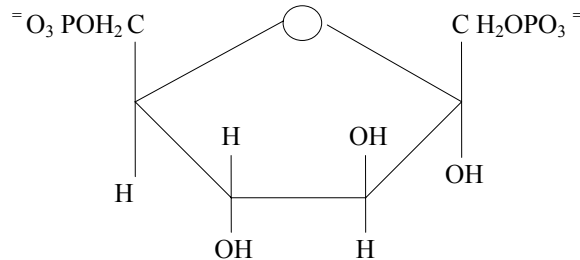


Figura 1 - Representação esquemática da Alfa-D-frutose-1,6-bisfosfato

Este açúcar bisfosforilado é um metabólito 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. Tem a capacidade de estimular a síntese de lipídeos no fígado, levedura e *E. coli*, enquanto estimula a lipólise no tecido adiposo (45,17).

2.5.3.1.1. EFEITO SOBRE AS ENZIMAS DA GLICÓLISE

A FBP afeta a atividade de muitas enzimas que participam na conversão de glicose a ácido láctico. Apesar de não ter o mesmo efeito em todas as células e em diferentes espécies, o efeito em cada caso é de estimular as reações na glicólise (Tabela I).

Tabela I - A Frutose-1,6-bisfosfato e as enzimas da glicólise

ENZIMA	EFEITO DA FBP	CÉLULA OU TECIDO
Fosfofrutoquinase	ativa	Músculo, coração, cérebro e fígado de mamíferos.
Piruvatoquinase	ativa	<i>E. coli</i> , tecido adiposo, rim, fígado e outros.
Lactato desidrogenase	ativa	<i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , outros
Fosfoglucoisomerase	inibe a reação reversa	Músculo de coelho, fígado
Fosfoenol piruvato	ativa	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i>

Modificada a partir de KIRTLEY & McKAY (1977)

A ativação da fosfofrutoquinase (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 (46,47,48,49).

De uma maneira geral, a FBP não possui nenhuma ação sobre a atividade do lactato desidrogenase, mas a enzima de muitos microorganismos e actinomicetos possui um absoluto requerimento do açúcar bisfosforilado (17).

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 (17).

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 glicose-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 a frutose (quando estas ingerem frutose) a ter hipoglicemia (17).

A enzima fosfoglicomutase catalisa, como principal reação, a interconversão de Gli-1-P e Gli-6-P, usando como cofator a Gli-1,6-P₂. Esta enzima, que é inibida por ATP e citrato (50),

pode também ser inibida pela FBP (51), através de um mecanismo de competição com a Glicose 1,6-P₂.

2.5.3.1.2. EFEITO SOBRE AS ENZIMAS GLICONEOGÊNICAS

A FBP inibe muitas enzimas da gliconeogênese (Tabela II). Na via usual da gliconeogênese a FBP é substrato e inibidor da Frutose 1,6 bifosfatase (52). Esta enzima pode unir fortemente dois íons metálicos (Zn^{+2}/Mn^{+2}) por molécula e nestas condições pode unir 4 moléculas de substrato. As constantes de união diminuem a medida que os substratos vão se unindo, indicando uma interação negativa a medida que aumenta o número de ligantes (53). Com estes dados pode-se concluir que a FBP pode ser um importante modulador da gliconeogênese.

Tabela II - Efeito da FBP sobre as enzimas da gliconeogênese.

Enzima	Efeito da FBP	Célula ou tecido
Frutose-1,6-bifosfatase	Inibe	Fígado de coelho
Fosfoglicoisomerase	Inibe a reação inversa	Músculo e Fígado
Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase	Bloqueia a ativação	Cloroplastos, algas
Malato desidrogenase	Inibe	<i>Streptococcus faecalis</i>
Isocitrato liase	Inibe	<i>Pseudomonas indigofera</i>

Modificada a partir de KIRTLEY & McKAY (1977).

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 (53).

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 (17).

2.5.3.2. EFEITO PROTETOR DA FBP

Os estudos sobre o poder hepatóxico da galactosamina demonstraram que entre as drogas protetoras experimentais, a FBP aparece como sendo uma das mais interessantes. Por ser um açúcar bisfosforilado tem grande dificuldade em passar a membrana plasmática e, sendo uma substância fisiológica intracelular, pode apresentar muito poucos efeitos colaterais (54).

2.5.3.2.1. EFEITO SOBRE A ISQUEMIA CARDÍACA

Depois de uma obstrução arterial começa um período de isquemia. Uma lesão irreversível pode acontecer se, em um pequeno período de tempo, não se restitui a energia da célula. É conhecido que no caso da isquemia, a produção da energia para a célula vem da via de Embden-Meyerhof. Baseando-se nestes dados, utilizou-se experimentalmente e clinicamente a administração de glicose, insulina e potássio (55). Desde que estes autores publicaram os primeiros êxitos com esta terapia, foram publicados trabalhos que apresentaram muitas contradições com tal tratamento para o infarto do miocárdio.

Uma das etapas críticas durante a isquemia é a inativação da fosfofrutoquinase (PFK-1), induzida por um progressivo aumento da acidez intracelular, provocando uma diminuição da concentração de FBP (56,57,58).

MARKOV et al. (1980), utilizando um modelo de isquemia em cães através de uma perfusão cardíaca e monitorando parâmetros hemodinâmicos, eletrocardiográficos e efeitos

metabólicos, administraram FBP aos cães e observaram uma melhora nas funções mecânicas do coração, demonstrando que o açúcar bisfosforilado causava uma regressão nas modificações eletrocardiográficas provocadas pela isquemia. Além disso, verificaram que o tratamento com FBP aumentava significativamente o ATP e a creatinina fosfato no miocárdio normal e isquêmico (59).

Verificou-se que a quantidade de ácido láctico estava aumentada e sugeriu-se que a FBP aumentava a oxidação da glicose. O mecanismo de ação do açúcar bisfosforilado, segundo os autores, é que este poderia atravessar a membrana plasmática e dentro da célula ativar a glicólise anaeróbica, 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.

EDDY et al. (1981) puseram em dúvida este trabalho, afirmando que por dois motivos básicos não podiam aceitar a teoria de Markov sobre o possível mecanismo de ação da FBP. Primeiro, que a FBP um composto bisfosforilado, não pode atravessar a membrana plasmática e, segundo, em perfusões do coração isquêmico, a enzima chave para a glicólise é a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e não a PFK-1. Neste mesmo trabalho, EDDY et al. admitiram que o efeito protetor do açúcar existe mas que não é um efeito direto, sugerindo que sua ação poderia ser através de efeitos indiretos, possivelmente inibindo alguns efeitos das catecolaminas (60).

HASSINEN et al. (1991), utilizando um modelo de coração perfundido, monitoraram vários parâmetros cardíacos, entre eles 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 uma diminuição do consumo de oxigênio, um

aumento da pressão diastólica, uma diminuição na pressão sistólica e uma pequena diminuição do fluxo coronário quando se comparava com um coração controle, ou seja, o coração isquêmico sem tratamento com o açúcar bisfosforilado. Os mesmos autores observaram também, que a relação NADH/NAD^+ no coração isquêmico aumentava quando se administrava a FBP e com isto podia aumentar a energia da célula com um conseqüente aumento de ATP. Além disso, verificaram que a FBP podia diminuir o cálcio iônico extracelular e, por isso, sugeriram que o açúcar bisfosforilado podia melhorar o rendimento mecânico e respiratório do coração isquêmico através da diminuição do cálcio iônico extracelular. De todo modo, ao utilizar EGTA, um quelante de cálcio, não puderam confirmar totalmente esta teoria. No caso específico do coração, 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 do açúcar bisfosforilado sobre este órgão e não um efeito geral contra a lesão celular provocada pela isquemia (61).

2.5.3.2.2. EFEITO SOBRE ERITRÓCITOS

LAZZARINO et al. (1984) incubaram FBP com plasma e sangue total humano em condições que pudessem reproduzir aquelas utilizadas clinicamente e observaram que a principal resposta era o aumento do açúcar (FBP) intraeritrocitário, que se acompanhava por uma significativa diminuição da glicose do sangue (62). RIGOBELLO & GALZIGNA (1982) mostraram que a interação da FBP com a membrana de eritrócitos induzia modificação na permeabilidade dos íons, incluindo a captação de potássio e a eliminação de hidrogênios, com o conseqüente aumento do pH intracelular e ativação da PFK-1, resultando em uma estimulação da glicólise (63). Tendo em vista os resultados citados, GIACOSA et al. (1987) trataram pessoas (voluntários) com FBP para verificar se esta poderia baixar os níveis de glicose no

sangue (64). Utilizando uma concentração de 200 mg/kg de peso corporal em administração intravenosa, observaram que o açúcar bisfosforilado diminuía a resposta hiperglicêmica na ingestão de glicose e que os níveis de insulina plasmática estavam elevados quando os níveis de glicose estavam baixos. Em 1983, GIORDANO & DE SANTO, observaram que os níveis de insulina no plasma se encontravam elevados quando os pacientes receberam FBP (65). AVOGARO et al. (1979), verificaram que o tratamento com o açúcar reduzia os valores basais da glicose plasmática. Os resultados destes estudos sugerem que a administração exógena de FBP pode ter importância na regulação da homeostasia da glicose, influenciando na concentração de insulina (66).

É conhecido que a preservação do sangue em bancos de sangue provoca uma diminuição dos níveis intraeritrocitários de 2,3-difosfoglicerato (67). MARKOV et al. (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 (59). Estes resultados sugerem que a FBP, pode ser utilizada como preservante em bancos de sangue.

2.5.3.2.3. PROTEÇÃO DA LESÃO RENAL PROVOCADA PELA ISQUEMIA

A lesão renal produzida pela isquemia é uma complicação que aparece durante alguns procedimentos cirúrgicos, quando o fluxo de sangue é interrompido. O córtex renal pode ser especialmente sensível à hipóxia e isquemia porque as enzimas necessárias para a glicólise estão presentes em baixas concentrações (68). Estas observações são utilizadas para explicar a severa lesão observada nestas células durante a isquemia.

DIDLAKE et al. (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 (69). Isto demonstrou que este açúcar bisfosforilado não protege totalmente o 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 furesimida, já que estes protegem através de um mecanismo que está relacionado com a excreção de solutos (70,71,72).

2.5.3.2.4. PROTEÇÃO CONTRA A FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES

A formação de radicais livres na reperfusão pós-isquêmica ou através de substâncias tóxicas parece ser um mecanismo importante no desenvolvimento da lesão celular (73,74,75,76). Para proteger o organismo destes efeitos citotóxicos, as células têm desenvolvido mecanismos enzimáticos antioxidantes tais como enzimas (superóxido dismutase, catalase) ou antioxidante endógenos (ácido ascórbico, vitamina E). O tratamento com superóxido dismutase e vitamina E tem proporcionado êxitos clínicos para combater lesões mediadas por estes radicais. 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 (77).

Em 1986, SCHINETTI & LAZZARINO, utilizando um éster de forbol (miristato acetato de forbol) para produzir radicais superóxido em neutrófilos humanos, 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 (78), sugerindo que o açúcar poderia ter um efeito antiinflamatório.

Demonstrou-se que 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 (79).

CÁRDENAS et al (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 (80).

2.5.3.2.5. AÇÃO PROTETORA DA FBP SOBRE ISQUEMIA EM CÉREBRO E ASTRÓCITOS

GREGORY et al. (1989 e 1990) e VEXLER et al. (2002) investigando culturas de astrócitos demonstraram em células submetidas a hipoxia que a liberação de lactato desidrogenase diminuía quando se adicionava ao meio de cultura FBP. 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 hipoxia, concluindo que o açúcar bisfosforilado atuava preservando os

níveis de ATP e com isto impedia a lesão e a conseguinte liberação de lactato desidrogenase ao meio (81,82,83). DONOHOE et al. (2001) observou não só a preservação dos níveis de ATP como a capacidade de estabilização dos níveis de Ca^{+2} durante a hipoxia (84).

FARIAS et al. (1989) provaram a ação da FBP sobre as funções e metabolismo cerebral em coelhos sujeitos a coma hipoglicêmica. 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 (85). Com estas conclusões, FARIAS et al. (1990) tentaram observar se a FBP poderia ter um efeito protetor para o cérebro durante a isquemia anóxica. Verificaram que os animais tratados com o açúcar apresentavam menos alterações neurológicas que os animais controles (não tratados com FBP) e sugeriram que o metabólito poderia oferecer um efeito protetor para o cérebro durante a isquemia anóxica (86).

O efeito neuroprotetor da FBP também foi observado a em slices de cérebros de ratos submetidos à hipoxia (87) . Sugere-se também que o açúcar atue como protetor do Sistema Nervoso Central quando administrada 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.

2.5.3.2.6. PROTEÇÃO CONTRA A AÇÃO DE DROGAS

O polihalogenado composto Tetracloro de Carbono (CCl_4) é uma conhecida hepatoxina que pode provocar extensa lesão no fígado podendo provocar a morte do animal.

RAO & MEHENDALE (1989) valorizaram o papel protetor da FBP contra esta droga. Observaram que as enzimas plasmáticas AST (Aspartato amino transferase) e ALT (Aspartato alanina transferase), que se originam do dano hepático, estavam significativamente menos aumentadas em animais tratados com CCl₄ + FBP do que aqueles somente com CCl₄. Dois metabólitos hepáticos, “ATP” e “ADP”, que diminuía pela ação da toxina, recuperavam-se parcialmente pela ação do açúcar bisfosforilado. Nestes mesmos estudos do poder de regeneração do fígado, depois da ação lesiva do composto halogenado, comprovaram que as enzimas ornitina-descarboxilase e espermidina N-acetiltransferase, que são importantes para a regeneração celular, estavam significativamente mais aumentadas nos animais tratados com CCl₄ + FBP que aqueles tratados somente com CCl₄ (88). RAO & MEHENDALE (1990) encontraram os mesmos efeitos do açúcar bisfosforilado quando utilizaram como agente tóxico o chlordecone em combinação com CCl₄ (89).

FARIAS et al. (1989), utilizando como agente hepatóxico a galactosamina, verificaram que a FBP protegia o fígado do dano que pode provocar o açúcar aminado. Para realizar este estudo utilizaram parâmetros histológicos e marcadores plasmáticos da lesão hepática (AST e ALT). Os resultados com relação as enzimas plasmáticas podem ser vistos na Tabela III (90).

Tabela III - Efeito protetor da FBP em ratos tratados com galactosamina

Parâmetro	Controle	GalN	GalN + FBP	Significância GalNx GalN+ FBP
SGPT (U/L)	63±3	6172±1187	149±40	P<0,0001
SGOT (U/L)	249±52	9611±2691	563±187	P<0,005
γGT(U/L)	0,86±0,40	7,75±0,33	0,88±0,33	P<0,001
Bilirrubinas(mg/dl)	0,13±0,03	2,12±0,79	0,19±0,03	P<0,05

Modificada apartir de FARIAS et al., 1989. GalN= Galactosamina

Estudos sobre a hepatotoxicidade da galactosamina já foram bem definidos, sendo testados vários compostos como agentes protetores contra os efeitos da hepatoxina. Entre as drogas experimentais está a FBP que apresenta um efeito protetor celular importante contra sua ação. O uso de galactosamina em conjunto com FBP mostrou-se menos lesivo do que no grupo controle (91). Os estudos realizados usaram como parâmetros de lesão marcadores plasmáticos e celulares (ATP).

Realizando experimentos “in vitro”, RIZZOLI et al. (1990) verificaram que o álcool podia aumentar a entrada de cálcio em células renais em ratos. Este efeito é dependente da concentração de cálcio (extracelular) e, também, do tempo de incubação (92). 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 et al. (1989) (16).

2.5.3.2.7. EFEITO PROTETOR NA SEPSE POR *ESCHERICHIA COLI*

Em recente trabalho do nosso grupo, foi induzida sepse em ratos Wistar, com a introdução via intraperitonal de uma cápsula de gelatina contendo fezes de ratos mais uma solução de *Escherichia coli*. Os ratos foram divididos em três grupos, um grupo controle onde foi realizada laparotomia, 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 (14).

2.5.3.2.8. PODER ANTIINFLAMATÓRIO DA FBP

OYANAGUI (1998), comprovou o efeito antiinflamatório da FBP quando associada à dexametasona em edema de pata de ratos (93).

3- OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GERAL

- Avaliar potenciais mecanismos de ação da Frutose-1,6-bisfosfato (FBP) no tratamento da sepse experimental.

3.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito antiinflamatório *in vivo* da FBP.
- Avaliar *in vitro* o efeito da FBP sobre células mononucleares humanas (PMNCs) estimuladas por fitohemaglutinina (PHA).
- Verificar se a FBP possui efeito antimicrobiano *in vitro*.
- Relacionar a ação de bloqueadores de canais de potássio (clorpropamida) com a ação da Frutose-1,6-bisfosfato sobre células mononucleares humanas (PMNCs) estimuladas por PHA.
- Avaliar *in vitro* o efeito da FBP na liberação de FNT- α por células mononucleares humanas (PMNCs) estimuladas por lipopolissacarídeos (LPS).

4 - REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Matot I, Sprung CL. Definition of Sepsis. *Intensive Care Medicine* 2001; 27: 53-59.
2. Davies MG, Hagen PO. Systemic inflammatory response syndrome. *J Surg* 1997; 84:920-935
3. Auler Junior JO, Carvalho MJ. Fisiopatologia e Tratamento do Choque. *Rev Bras Anest* 1991; 41(4):257-265.
4. Chedid AD, Kruehl CDP. Choque Séptico. *ACTA Médica* 1979; 79:113-119.
5. Dinarello CA. Proinflammatory and antiinflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997; 112(6): 321S-329S.
6. Ogbiene FP, Rosenberg AS, Lotze M et al. Interleukin-2 administration causes reversible hemodynamic changes and left ventricular dysfunction similar to those seen in septic shock. *Chest* 1988; 94: 750-754.
7. Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL et al. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet* 1993; 341: 643-647.
8. Dal Nogare AR. Southwestern Internal Medicine Conference: Septic Shock. *The American Journal of the Medical Sciences* 1991; 302(1): 50-65.
9. Kilbourn RG, Gross SS, Jubran A et al. NG-methyl-L-arginina inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proc Nat Acad Sci USA* 1990; 87: 3.629-3.632.
10. Nilius B, Hess P, Lansman JB, Tsien RY. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 1985; 316: 443.
11. Nowycky MC, Fox AP, Tsien RY. Three types of neuronal calcium channels with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 1985; 316: 440.

12. Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ. T-cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free Ca^{2+} and membrane potential in lymphocytes. *Nature* 1982; 295: 68.
13. Gelfand EW, Mills GB, Cheung RK, Lee JWW, Grinstein S. Transmembrane Ion Fluxes during Activation of Human T lymphocytes: Role of Ca^{2+} , Na^+/H^+ Exchange and Phospholipid Turnover. *Immunological Reviews* 1987; 95: 59-87.
14. Nunes FB, Pires MGS, Alves Filho JCA, Wachter PH, Oliveira JR. Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose 1,6 bisphosphate as cellular protection. *Crit Care Med* 2002; 30(9): 2069-2074.
15. Bickler PE, Kelleher JÁ. Fructose-1,6-bisphosphate stabilizes brain intracellular calcium during hypoxia in rats. *Stroke* 1992; 23: 1617-1622.
16. Galzigna L, Rizzoli V, Bianchi M, Rigobello MP, Scuri R. Some effects of fructose-1,6-bisphosphate on rat myocardial tissue related to a membrane-stabilizing action. *Cell Biochem Funct* 1989; 7: 91-96.
17. Kirtley ME, McKay M. Fructose-1,6-diphosphate: a regulator of metabolism. *Mol Cell Biochem* 1977;18: 141.
18. Mazer CD, Demas KA, Cason BA, Simpson P, Hickey RF. Uptake and metabolism of fructose-1,6-diphosphate by cell cultures of rat myocardium. *Anesthesiology* 1986; 65: A254.
19. Fasolato C, Deana R, Rigoni F, Galzigna L. Fructose-1,6-diphosphate improves the mortality and other functions of bovine spermatozoa. *Med Sci Res* 1987; 15:203-204.
20. Roig T, Bartrons R, Bermúdez J. Exogenous fructose-1,6-bisphosphate reduces K^+ permeability in isolated rat hepatocytes. *American Physiological Society*. 1997; C473-C478.
21. Nakamura, LT, Barros IC. Sepsis. *Prática hospitalar* 1986. 1 (2): 33-36.
22. Nyhus LM, Shumer W. *Tratamento do Choque*. São Paulo: Manole; 1976. 219.

23. Parrillo JE. Patogenic mechanism of septic shock. *The New England J. Med.* 1993. 328 (20): 1471-1477.
24. Baumann H, Gauldie J. The Acute Phase Response. *Immunology Today* 1993. 15 (2): 74-80.
25. Mims CA, Play Fair JHL, Roitt IM, Wakelin D, Williams R. *Microbiologia Médica*. São Paulo, Manole; 1995. 417.
26. Travers P, Janeway C. *Imunobiologia - O Sistema Imunológico na Saúde e na Doença*. 2^a ed. São Paulo: Artes Médicas, 1997.
27. Harbrecht BG, Silvio M, Demetris AJ, Simmons RL, Billiar TR. Tumor Necrosis Factor- α Regulates *In Vivo* Nitric Oxide Synthesis and Induces Liver Injury During Endotoxemia. *Hepat.* 1994. 20 (4): 1055-1060.
28. Hack CE, Nuijenb JH, Felt Bersma RJF. Elevated Plasma Levels of the Anaphylatoxins C3a and C4a are Associated With a Fatal Outcome in Sepsis. *Am. J. Med.* 1994. 86: 20-26.
29. Metrangolo L, Fiorillo M, Friedman G, Silance P G, Kahn RJ, Novelli P, Vicent JL. Early hemodynamic course of septic shock. *Crit. Care Med.* 1995. 23: 1931-1975.
30. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997. 1294 p.
31. Smith EL, Hill RL, Lehman IR, Lefkowitz RJ, Handler P, White A. *Bioquímica Mamíferos*. Rio de Janeiro: Guanabara; 1996.. 620 p.
32. Robbins S, Cotran RS, Kumar U. *Patologia Estrutural e Funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara; 1988. 1277 p.
33. Failace R. *Hemograma: Manual de Interpretação*. Porto Alegre: Artes Médicas; 1995. 198 p.

34. Rodriguez-Erdmann F. Syndromes of Intravascular Coagulation. Surg. Ann 1977. 9: 1.
35. Apel J, Hamann HP, Weiss R. Zu Vorkommen und Antibiotika Resistenz Bakterieller Infektions Erreger in Urinproben von Katzen. Kleintierpraxis 1989. 34: 467-472.
36. Service RF. Antibiotics That Resist Resistance. Science 1995. 270: 724-727.
37. Doern GV, et al. Bacterial pathogens isolated from patients with skin and soft tissue infections: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial Surveillance Program. Diagn. Microbiol Infect Dis 1999. 34 (1):65-72.
38. Livermore DM. Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1992. 36(9): 2046-8.
39. Alvarez-Lerma F. Modification of empiric antibiotic treatment in patients with pneumonia acquired in the intensive care unit. Intensive Care Med 1996. 22:387:94.
40. Dias FS et al. Choque. Porto Alegre: EDIPURS; 2002. 592p.
41. Bennett IL, et al. The effectiveness of hydrocortisone in the management of severe infection. JAMA 1999. 183:462-65.
42. Bollaert PE, et al. Reversal of late septic shock in with supraphysiologic doses of hydrocortisone. Crit Care Med 1999. 27:723-32
43. Briegel J, et al. Stress doses of hydrocortisone reverse hyperdynamic septic shock: A prospective, randomized, double-blind, single center study. Crit Care Med 1999. 27:723-32
44. Annane D. Steroids of Septic Shock: The French Randomised Trial. J. Endotox. Research 2000. 6:S34.
45. Chlouverakis C. The Lipolytic Action of Fructose-1,6-Diphosphate. Metabolism 1968. 17: 708-716.

46. Passonneau JV, Lowry DM. P-fructokinase and the control of the citric acid cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1963. 13: 372-376.
47. Ramaiah A. Pasteur effect and phosphofructokinase. *Curr. Top. Cell. Regul* 1974. 8: 297-345.
48. Sols A. Multimodulation of enzyme activity. *Curr. Cell. Regul* 1981. 19: 77-101.
49. Tornheim K, Lowenstein JM. Control of phosphofructokinase from rat skeletal muscle. Effects of fructose diphosphate, AMP, ATP and citrate. *J. Biol. Chem* 1976. 251: 7322-7328.
50. Pontecorvo G, Carfagna M, Fucci L, Gaudia L. Effects of various metabolites on two phosphoglucomutase allosyme activities from *Drosophila melanogaster* *Biochem. Genet.* 1986. 24: 397-403.
51. Bartrons R, Carreras M, Climent F, Carreras J. Inhibition of phosphoglucomutase by fructose 2,6 biphosphate. *Biochem. Bioph. Act.* 1985. 842: 52-55.
52. Liu F, Fromm HJ. Relationship between thiol group modification and the binding site for fructose 2,6 biphosphate on rabbits liver fructose 1,6 biphosphatase. *J. Biol. Chem.* 1988. 263: 10035-10039.
53. Benkovic SJ, Maine MM. Mechanism of action of fructose 1,6 biphosphatase. *Advances in enzymology* 1982. 32: 45-81.
54. Roig T, Oliveira JR, Bartrons R, Bermudez J. Fructose 1,6 – bisphosphate protects against D-galactosamine toxicity in isolated rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 1994. 266: 1722 - 1728
55. Sodi-Pallares D, Ponce de Leon J, Bisteni A, Medrano GA. Potassium, glucose, and insulin in myocardial infarction. *Lancet* 1969. 1: 1315-1318.
56. Mansour TE. Studies on heart phosphofructokinase purification, inhibition and activation. *J. Biol. Chem.* 1963. 238: 2285-2290.

57. Williamson JR. Glycolitic control mechanism. II. Kinetics of intermediate changes during the aerobic anoxic transition in perfused rat heart. *J. Biol. Chem.* 1966. 241: 5026-5030.
58. Farias LA, Gregory GA, Willis M. Effect of Fructose 1,6 diphosphate, glucose, and saline on cardiac resuscitation. *Anesthesiology* 1986. 65: 595-601.
59. Markov AK, Oglethorpe NC, Terry J, Grogan JB, Hellems HK. Hemodynamic, electrocardiographic, and metabolic effects of fructose diphosphate on acute myocardial ischemia. *Am. Heart J.* 1980. 100 (5): 639-646.
60. 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. 24: H576-H582.
61. Hassinen IE, Nuutinen EM, Ito K, Nioka S, Lazzarino G, Giardina B, Chance B. Mechanism of the effect of exogenous fructose 1,6 bisphosphate on myocardial energy metabolism. *Circulation* 1991. 83(2) 584-593.
62. Lazzarino G, Cattani L, Costrini R, Muliere L, Candiani, A, Galzigna L. Increase of intraerythrocytic fructose 1,6 diphosphate after incubation on whole human blood with fructose 1,6 diphosphate. *Clin. Biochem.* 1984. 17: 42-45.
63. Rigobello MP, Galzigna DR. Enzymatic events following the interaction of fructose 1,6 diphosphate with red cell membranes, in *Advances in Pathology*, Levy E., Ed. pp. 216. Oxford Pergamon Press 1982.
64. Giacosa A, Sukkar GS, Chiti D, Marchetti M. Effects of fructose 1,6 diphosphate on the hyperglycemic response to intravenous glucose load. *Current Therapeutic Research* 1987. 41: 874-881.
65. Giordano C, De Santo NG. Metabolic aspects of fructose diphosphate in total parenteral nutrition. *IRCS Med. Sci.* 1983. 11: 173-174.

66. Avogaro P, Bittolo Bon G, Pais M. First results obtained with fructose 1,6 diphosphate in the "hyperinsulinaemia" (excessive insulin release). *Pharmacol. Res. Commun.* 1979. 11: 121-131.
67. Adamson JW, Finch CA. Hemoglobin function, oxygen affinity and erythropoietin. *Ann Rev. Physiol.* 1975. 37: 351-359
68. Guder WG, Schmidt U. Substrate and oxygen dependence of renal metabolism. *Kidney Int.* 1976. 10: s32-s38.
69. Didlake R, Kirchner KA, Lewin J, Bower JD, Markov A. Protection from ischemic renal injury by fructose 1,6 diphosphate infusion in the rats. *Circulatory Shock* 1985.16: 205-212.
70. Teschan PE, Lawson NL. Studies in acute renal failure. Prevention by osmotic diuresis, and observations on the effect of plasma and extracellular volume expansion. *Nephron* 1966. 3:1-16.
71. Cronin RE, Torrente A, Miller PD, Bulger JT, Schrier RW. Pathogenic mechanism in early norepinephrine-induced acute renal failure: Functional and histological correlates of protection. *Kidney Int.* 1978. 14: 115:125.
72. Patak RV, Fadem SZ, Lifschitz MD, Stein JH. Study of factors which modify the development of norepinephrin-induced acute renal failure in the dog. *Kidney Int.* 1979. 15: 227: 237.
73. McCord JM. Oxyxen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England J. Med.* 1985. 312: 159-163.
74. Lanir A, Jenkins RL, Caldwell G, Lee RGL, Khettry U, Clouse ME. Hepatic transplantation survival: correlation with adenine nucleotide level in donor liver. *Hepat.* 1988. 8:471-475.

75. Galaris D, Eddy L, Arduini A, Cadenas E, Hochstein P. Mechanisms of reoxygenation injury in myocardial infarction: implications of a myoglobin redox cycle. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989. 160: 1162-1168.
76. Boobis AR, Fawthrop DJ, Davies DS. Mechanisms of cell death. *TIPS* 1989. 10: 275-280.
77. Babior BM, Peters WA. The O₂-producing enzyme of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 1981. 256: 2321-2323.
78. Schinetti ML, Lazzarino G. Inhibition of phorbol ester-stimulated chemiluminescence and superoxide production in human neutrophils by fructose 1,6 diphosphate. *Biochem. Pharmacol.* 1986. 35: 1762-1764.
79. Tavazzi B, Cerroni L, Di Pierro D, Lazzarino G, Nuutinen M, Starnes JW, Giardina B. Oxygen radical injury and loss of high-energy compounds in anoxic and reperfused rat heart: prevention by exogenous fructose 1,6 diphosphate. *Free Radic. Res. Commun* 1990. 10: 167-176.
80. Cardenas A, Hurtado O, Leza JC, Lorenzo P, Bartons R, Lizasoain J, Moro NA. 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-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2000. 362:208-212.
81. Gregory GA, Yu ACH, Chan PH. Fructose 1,6 biphosphate protects astrocytes from hypoxic damage. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 1989. 9(1):29-34
82. Gregory GA, Welsh FA, Yu AC, Chan PH. Fructose 1,6 biphosphate reduces ATP loss from hypoxic astrocytes. *Brain Res.* 1990. 516:310-312.

83. Vexler ZS, Wong A, Francisco C, Manabat C, Christen S, Tauber M, Ferriero D.M, Gregory G. Fructose-1,6-bisphosphate preserves intracellular glutathione and protects cortical neurons against oxidative stress. *Brain Res.* 2003. 17;960(1-2):90-8.
84. Donohoe PH, Fahlman CS, Bickler PE, Vexler, ZS, Gregory GA. Neuroprotection and intracellular Ca²⁺ modulation with fructose-1,6-bisphosphate during in vitro hypoxia-ischemia involves phospholipase C-dependent signaling. *Brain Res.* 2001. 917(2):158-
85. Farias LA, SUN J, Markov AK. Improved brain metabolism with fructose 1,6 diphosphate during insulin-induced hypoglycemic coma. *Am. J. Med. Sci.* 1989. 296: 294-299.
86. Farias LA, Smith EE, Markov AK. 1990. Prevention of ischemic-hypoxic brain injury and death in rabbits with fructose 1,6 diphosphate. *Stroke* 1990. 21: 606-613.
87. Espanol MT, Litt L, Hasegawa K, Chang LH, Macdonald JM, Gregory G, James TL, Chan PH. Fructose-1,6-bisphosphate preserves adenosine triphosphate but not intracellular pH during hypoxia in respiring neonatal rat brain slices. *Anesthesiology* 1998. 88(2): 461-72.
88. Rao SB, Mehendale HM. Protective role of fructose 1,6 bisphosphate during CCl₄ hepatotoxicity in rats. *Biochem. J.* 1989. 262: 721-725.
89. Rao SB, Mehendale HM. Protection from chlordecone (kepone) - potentiated CCl₄ hepatotoxicity in rats by fructose 1,6 bisphosphate. *Int. J. Biochem.* 1990. 21: 949-954.
90. Farias LA, Bennet WS, Mihas AA, Xu CB, Markov AK. Fructose 1,6 diphosphate prevents galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *Gastroenterology* 1989. 96, A597.
91. Oliveira JR, Rosa JL, Ambrosio S, Bartrons R. Effect of Galactosamine on Hepatic Carbohydrate Metabolism: Protective Role of Fructose 1,6-Bisphosphate. *Hepatology* 1994. 15 (6), 1147-1153.

92. Rizzoli V, Battilana G, Galzigna L. Fructose 1,6 diphosphate counteracts ethanol stimulated calcium uptake in isolated BHK cell. *Mol. Cell Biochem.* 1990. 95: 89-93.
93. 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.

ARTIGO 1

Nunes FB, Graziottin CM, Alves-Filho JC, Lunardelli A, Pires MGS, Wächter PH, De Oliveira JR. An assessment of fructose 1,6 bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. *Pharmacological research* 2003. 47:35-41.

An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis

Fernanda B. Nunes*, Cássio M. Graziottin, José Carlos F. Alves Filho, Adroaldo Lunardelli, Melissa G.S. Pires, Paulo H. Wächter, Jarbas R. De Oliveira

Laboratório de Pesquisa em Biofísica, Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil

Accepted 5 August 2002

Abstract

Tissue lesion mechanisms provoked by sepsis include the infectious process, inflammation, and cellular energy deficit. We chose to test fructose-1,6-bisphosphate (FBP) because of its possible anti-inflammatory and antimicrobial actions. Wistar rats were used and divided into three experimental groups: a control group ($n = 10$), in which a capsule was introduced into the peritoneum of the animals; a septic group ($n = 10$), in which a capsule containing non-sterile fecal matter was introduced together with *Escherichia coli* (1.5×10^9 CFU); and a septic group treated with FBP 500 mg/kg ($n = 10$). The blood cell tests revealed that levels of leukocytes increased significantly in the septic group when compared to both the septic group treated with FBP and the control group. The blood cultures were 100% positive in both the septic group and the septic group treated with bisphosphorylated sugar. The antibiogram only revealed an inhibitory halo in the case of the antibiotic ampicillin, there was no such indication for FBP. The anti-inflammatory power of FBP remained at 60% for 5 h in the rats that received the carrageenan injection. What is more, the sugar reduced the levels of ionic calcium in relation to the control group. This data proves the validity of using FBP in the treatment of sepsis, possibly due to its anti-inflammatory rather than antimicrobial action.

© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Sepsis; Fructose-1,6-bisphosphate; Inflammation; Antimicrobial

1. Introduction

Dysfunction of the microcirculation is recognized as the most significant factor of cellular lesion in sepsis [1]. The hemodynamic alterations that occur during the clinical course of septic shock are a result of the endotoxins released by the bacteria. They induce a sequence of inflammatory alterations, including the activation of effector cells and the release of an infinite number of mediators, among them cytokine, adhesion molecules, platelet activation factors, and nitric oxide (NO) [2]. These events lead to increased capillary permeability and vasodilation, provoking interstitial edema, thus contributing to the reduction of the oxygen supply to the tissues [1]. This results in the predominance of anaerobic glucose with the increase in lactic acid and cell damage [3].

Because of the greater vascular permeability, there is an increased concentration of the blood elements (hemoconcentration) which in turn augments blood viscosity. This causes a progressive fall in circulation velocity and the oxygen supply to the inflamed area is reduced [4]. Phenomena occur which depress the production of cell energy and, consequently, the energy levels fall may provoke cell death [5].

This alterations leads to a mobilization of the bone marrow reserve which is characterized by the increase in the immature cells [6], leading to the endothelial adhesion of these cells that depends on both the endothelial and calcium ion (Ca^{2+}) charge [7].

Despite medical efforts, sepsis remains the major cause of hospital death, mainly in intensive care units. The seriousness of the sepsis may also be associated with the indiscriminate and widespread use of antibiotics, which, with inadequate control and dosage, may augment the action of the microorganisms, aggravating the inflammatory condition. Antibiotics are victims of their own evolutionary force when used on a large scale, and their indiscriminate use permits the survival of some bacteria that survive and create strains resistant to their effects [8,9].

*Corresponding author. Present address: Moacir Santana, 60404, Intercap, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 91530-170, Brazil.

Tel.: +55-51-3203500x4147; fax: +55-51-3203612.

E-mail address: soebio@pucrs.br (F.B. Nunes).

The aim of this study was to research alternative drugs capable of reducing the morbidity and mortality that result from the septic process, focusing on the main tissue lesion mechanisms provoked by sepsis, the infectious process, inflammation, and the cellular energy deficit [10]. Of these drugs, fructose-1,6-bisphosphate (FBP) has been reported as showing therapeutic effects in a number of pathological situations such as ischemia, shock, and toxic lesions [11–14]. The beneficial effects of FBP have been documented in cardiac, renal, cerebral, hepatic, and intestinal (small intestine) dysfunctions [15–23]. Recently, we have demonstrated that the mortality rate of septic animals treated with FBP was 50%, while the control group was 100% after 24 h (Nunes and coworkers, in press). The effects of 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 [23]. The role of FBP as a possible therapeutic alternative in rats submitted to sepsis was examined, due to its probable anti-inflammatory and antimicrobial action.

2. Material and methods

2.1. Treatment with fructose-1,6-bisphosphate

The care and the use of the animals were performed according to the “Guiding Principles in the Care and Use of Animals” approved by the Council of the American Physiological Society. Male, Wistar rats, subject to a 12 h/12 h light/dark cycle and weighing 250–350 g were used. They were divided into three groups of 10 animals and anesthetized with 50 mg/kg (i.p.) of pentobarbital. The abdomen of each animal was shaved and cleaned with povidine–iodine solution. A 2-cm incision was made above the linea alba. In one group, sepsis was induced by means of the intraperitoneally introduction of a capsule consisting of fecal matter and a suspension of *Escherichia coli*. The concentration of *E. coli* suspension was measured using a spectrophotometer (650 nm), resulting in a D.O. between 1.180 and 1.200, which gave a total of 1.5×10^9 CFU [24].

Following the same procedure, sepsis was induced in a second group which at the same time were treated with 500 mg/kg (i.p.) of FBP (Sigma Chemical Co.). The control group received an empty agar capsule, introduced into the peritoneal cavity.

Those individuals that survived 15 h after the induction of sepsis were considered viable. This interval was established based upon the fact that all the untreated septic animals died within that period.

2.2. Hemoculture

Blood tests were carried out on all the animals in order to establish whether the animals were infected and if FBP exhibited any antimicrobial action. Around 1 ml of blood was

taken from each animal. Each sample was placed in a test tube containing a nutrient broth, which was then placed in an oven at 37 °C for 6 days. Initial bacterial analysis was based upon the existence of turbidity and the film formation of the nutrient broth (Becton Dickinson). The positive samples then underwent a further test in order to determine which microorganisms were present, while the negative samples underwent the same procedure in order to confirm their status [25].

2.3. Antibiogram

An antibiogram was carried out, in order to assess the true effects of bisphosphorylated sugar on the bacterial population, given its possible protective action in relation to sepsis. Petri plates were used for the replication of the *E. coli* bacteria derived from an ideal culture concentration of 1.8×10^8 microorganisms/ml, 0.6 in the Mac Farland scale [26], and another at a culture concentration of 2.0 in the same scale. These were maintained in a Mueller Hinton agar culture medium (Kirby–Bauer modified method) [27] and incubated for 24 h at 37 °C.

A solution of FBP, 294 mM (concentration based upon the dose used in the treatment of the septic rats) was added to a sterile antibiogram dish. A control sample of distilled water, representing the matrix of the sugar solution, was also placed on the disk. Another sample was submitted to the action of the antibiotic ampicillin 10 µg, which is of unquestionable antibacterial power against *E. coli*. The result was verified 24 h after the procedure and the absence or presence of an inhibition halo permitted evaluation.

2.4. Blood count

In order to analyze the hematological parameters, blood samples were collected from all the animals, by means of cardiac puncture 1 ml of blood was obtained 12 h after the initial procedure of each experimental group [28]. Both automatic counting (Coulter STKS) and manual counting (differential) with an optical microscope were used. Blood count analysis of the neutrophils, eosinophils, lymphocytes, and monocytes was performed in order to test the anti-inflammatory effects. At the same time, analysis was made of the anti-inflammatory effect of FBP on animals that received a subcutaneous injection of carrageenan.

2.5. Anti-inflammatory effect

The subcutaneous injection of carrageenan produces an inflammatory edema [29,30] that can be measured on the hind paws of rats [31].

The rats were divided into two groups: a control group ($n = 10$) that received an injection of NaCl (0.9%, i.p.) 30 min before the treatment with carrageenan (Sigma type IV), and another group ($n = 10$) that received 500 mg/kg (i.p.) of FBP under the same conditions as the control group. The carrageenan (30 mg) was diluted in 3 ml of

distilled water and 0.05 ml of this solution was administered in the right hind paw of each rat. The volume of each hind paw was determined prior to procedure (base value) and each hour following the procedure. The hind paw measurements of the group treated with the sugar were compared with those from the untreated group (inflammatory effect 100%) and the results expressed in terms of the percentage of inhibition and edema volume (ml). The extent of the inflammatory response was registered by the volume of the right hind paw (Plethysmometer Ugo Basile 7150) before (V_0) and after (V_1) the administration of the carrageenan.

$$\% \text{ Inflammation } (I) = \frac{V_1 - V_0}{V_0} \times 100$$

In order to establish whether it was possible to maintain the anti-inflammatory effect for longer and at acceptable levels, 500 mg/kg (i.p.) of the bisphosphorylated sugar was administered at 1-h intervals over a 5-h period. Oral administration was by means of a single 500 mg/kg dose, given minutes before the carrageenan injection.

2.6. Concentration of ionic calcium in solutions

Many authors report the presence of the ionic calcium in the mechanism of cellular lesion, in addition this ion is involved in the inflammatory process as a chemotaxic agent [32]. To determine whether fructose-1,6-bisphosphate had any effect on the extracellular ionic calcium, concentrations of 5 mM and 10 mM of fructose-1,6-bisphosphate and 5 mM of EGTA were dissolved in Krebs–Ringer bicarbonate solution (pH 7.4) with 2.5 mM of calcium chloride. The ionic calcium level was measured using a selective electrode in a Radiometer (ISA). The control was Krebs–Ringer bicarbonate solution (pH 7.4) with 2.5 mM of calcium chloride.

2.7. Statistical analysis

The results are expressed as means \pm S.E.M. Comparison between independent groups was made by the Student's

t-test. Multiple group comparisons were performed by ANOVA followed by Fisher's protected least significant difference test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Hemocultures

No positive hemocultures were obtained from the control group, while both the septic group and the FBP-treated septic group were 100% positive. All the cultures from both of these groups, only indicated the presence of *E. coli* in the samples taken. Fig. 1 shows the percentage of positive blood samples taken from the experimental groups.

3.2. Antibiogram

The control group (bacteria incubated in distilled water) showed no signs of resistance to the bacterial proliferation (there was no inhibitive halo), thus it did not act as an antimicrobial substance (Fig. 2a); the dishes incubated with the solution of FBP also showed no inhibitive halo to the growth of *E. coli* (Fig. 2b); the bacterial cultures of *E. coli* incubated with the antibiotic ampicillin 10 μ g showed a visible halo of inhibition, around 27 mm (Fig. 2c), clearly indicating its efficacy as an agent detrimental to the population of microorganisms.

3.3. Hemograms

The results of the hemograms in the experimental groups (control, septic, and FBP-treated septic groups) are represented in Fig. 3 (where the means and S.E.M. of these values are shown). Note that the leukocyte count is higher in the septic group than in the FBP-treated septic group and the control group. This may be related to the increase in the number of immature cells in the septic group, which

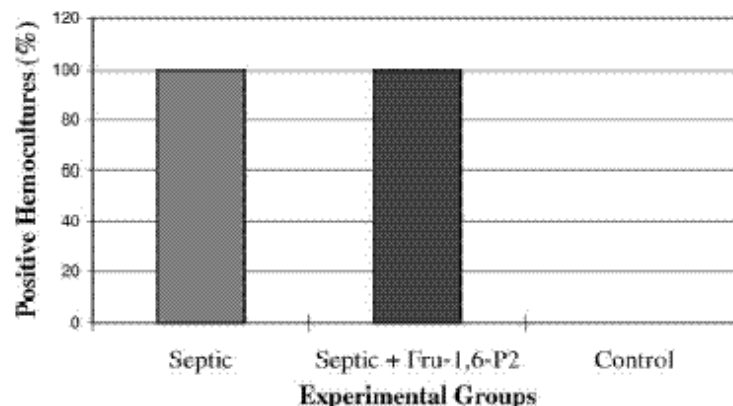


Fig. 1. Percentage of positive hemocultures in the experimental groups.

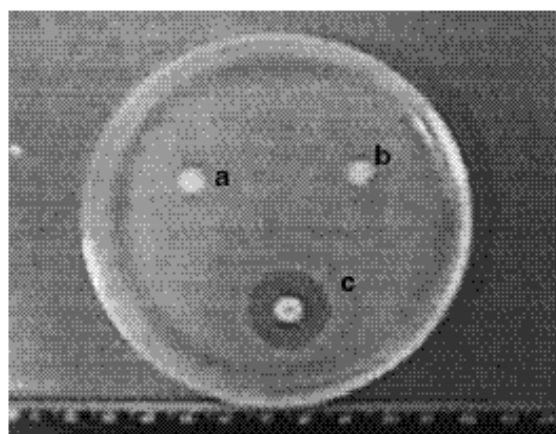


Fig. 2. Culture of *E. coli* after 24-h incubation; (a) distilled water, absence of inhibition; (b) fructose-1,6-bisphosphate, absence of inhibition; (c) ampicillin 10 µg, visible halo of inhibition.

would indicate inflammation provoked by the sepsis. The monocyte count values are higher in the septic group than in the other two groups. This increase in the number of monocytes may be related to the systemic response of the organism to the endotoxins. The lymphocyte count values are significantly lower in the septic group and FBP-treated group when compared to the control group, there were no significant differences between the septic group and treated group. There were no significant differences in the segmented neutrophil and eosinophil count values between the septic group, treated group and the control group.

L leukocyte values in the experimental groups

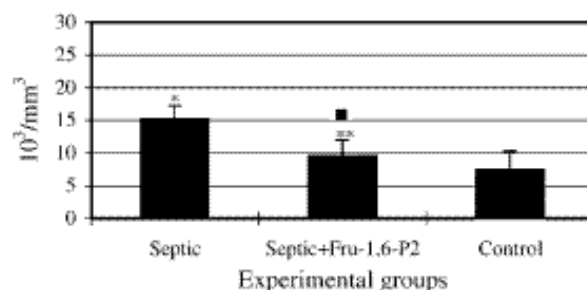


Fig. 3. Averages and standard deviations of leukocyte values in the experimental groups. The statistically significant differences between the control group, the septic and fructose-1,6-bisphosphate groups, are indicated by (*), $P < 0.05$, and, between the septic group and the fructose-1,6-bisphosphate group, are indicated by (■), $P < 0.05$.

3.4. Anti-inflammatory action

To determine whether FBP had anti-inflammatory action, 500 mg/kg of bisphosphorylated sugar was administered intraperitoneally at hourly intervals for a period of 5 h. The result showed that the anti-inflammatory effect was maintained at nearly 60% over this period. These results are represented in Fig. 4 and Table 1. The oral administration of 500 mg/kg of sugar shows an anti-inflammatory power of 60%, 1 h after administration, later diminishing. These results are shown in Fig. 5.

The anti-inflammatory effect of FBP

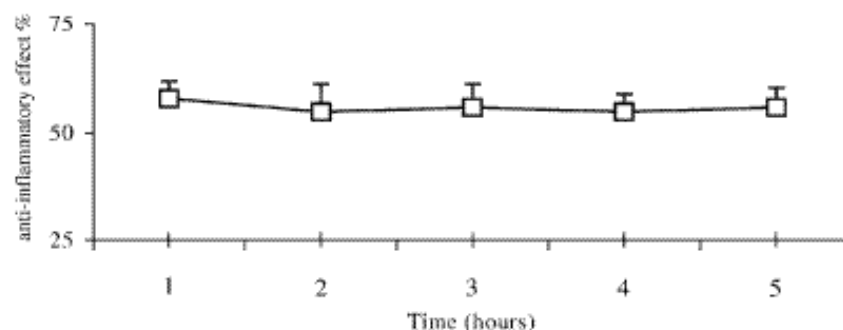


Fig. 4. The anti-inflammatory effect of the continuous intraperitoneal administration of fructose-1,6-bisphosphate (500 mg/kg).

Table 1

Anti-inflammatory effect of fructose-1,6-bisphosphate on carrageenan-induced right hind paw

Group	Edema volume (ml)				
	At 1h	At 2h	At 3h	At 4h	At 5h
Control	0.90 ± 0.06	1.05 ± 0.05	0.79 ± 0.02	0.68 ± 0.02	0.58 ± 0.01
FBP	0.31 ± 0.03*	0.44 ± 0.04*	0.31 ± 0.03*	0.27 ± 0.02*	0.21 ± 0.01*
% Inhibition	65.5	58.1	60.7	60.2	63.0

The fructose-1,6-bisphosphate (500 mg/kg) was administered intraperitoneally at 1-h intervals. Paw volume was measured at times indicated. Each value represents the mean ± S.E.M. for a group of 8–10 observations.

* $P < 0.01$; significant difference between drug treated and control group was observed as determined by Student's *t*-test.

Anti-inflammatory effect of the oral administration of FBP

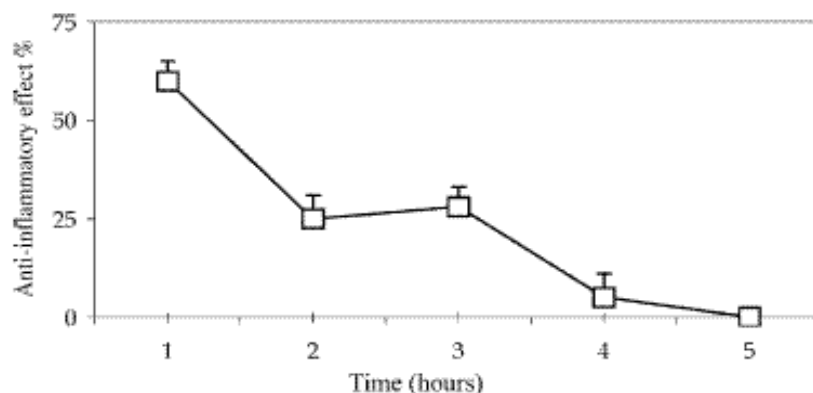


Fig. 5. Anti-inflammatory effect of the oral administration of fructose-1,6-bisphosphate.

Table 2

The effect of fructose-1,6-bisphosphate and EGTA on ionic calcium in solution.

	Ionic calcium (mMol/l)	Reduction to (%)
Control	2.00	–
Fructose-1,6-bisphosphate (5 mM)	1.32	66
Fructose-1,6-bisphosphate (10 mM)	1.02	51
EGTA (5 mM)	0.05	2.5

The ionic calcium was established as previously described in Section 2. The ion was dissolved in Krebs–Ringer (pH=7.4) solution. The final concentration was 2.5 mM.

3.5. Effect of FBP on the ionic calcium concentration

In order to verify whether anti-inflammatory effect of FBP was due to the fall in the level of ionic calcium, we tested its capacity to reduce ionic calcium in solution. In Table 2, we can see that 5 mM and 10 mM concentrations of FBP reduced the levels of ionic calcium to 66 and 51% of that of the control group, respectively. The EGTA, a potent calcium chelate of calcium, reduced the levels of ionic calcium to 2.5%.

4. Discussion

The previous results showed that the mortality rate in the treated septic rats was 20% of that of the untreated septic rats, which reached 100% after 15 h (Nunes and coworkers, in press). This shows that by some mechanism the bisphosphorylated sugar acted on the septic process, reducing the mortality rate of the animals. One hypothesis is that the FBP acts as an antibacterial agent, preventing the evolution of an irreversible septic process. This idea was discarded due to both the 100% positivity of the hemocultures in the FBP-treated septic group and the results of the antibiogram, in which the sugar did not have the anti-microbial action

in the proposed concentration. Therefore, there must have been some other mechanism by which the FBP decrease the mortality rate of the animals.

One of the probable effects of FBP is its anti-inflammatory action. It is believed that FBP may act to attenuate or even block the inflammatory response. A study of the blood elements of the experimental groups was necessary in order to establish the variables that could prove this theory.

Leukocyte levels were higher in the septic group, when compared to those in either the FBP-treated septic group or the control group. The lower leukocyte levels in the FBP-treated septic group would represent a reduction of their influx into the circulatory system. These elements are involved, to some degree, in the intensity of the inflammatory process. According to Mammen [6], there is a predominance of immature cell forms in the circulation during the septic process, a situation known as left deviation. In the FBP-treated group, the number of immature neutrophils present in the circulation was lower than that in the septic group. This reduction may be explained by the decrease of the signals provoke local chemical mediators that stimulate neutrophil chemotaxis. These signals are associated with the adhesion of the endothelial cells and leukocytes that in order to occur requires extra-cellular calcium. Hassinen et al. [33] showed that FBP could significantly decrease ionic calcium in solution, suggesting that the action mechanism of the sugar involved the reduction of this ion. Given this hypothesis, tests were performed in order to verify the applicability of this theory to our experimental model. As shown in Table 2, FBP demonstrated calcium chelating properties, given that the levels of this ion were maintained low in comparison to the control values, and this would, in all probability, impede or decrease neutrophil chemotaxis or adherence.

Monocytes, the levels of which were higher in the septic group, represent the first line of defense of the tissue against foreign invaders. The increased level of monocytes in the septic group suggests the stimulation of these elements by

the release of the endotoxins. FBP appears to attenuate this systemic response. The levels of lymphocytes diminished in the septic group and treated group, when compared with the control group. Authors have demonstrated that the lymphocytopenia is present in sepsis, and can occur in situations of stress of any origin, or in infectious diseases in general [7,8]. FBP did not have any apparent effect on the lymphocyte population. So it was decided to test whether the bisphosphorylated sugar really had some anti-inflammatory action.

Using a dose of 500 mg/kg intraperitoneally (Fig. 4; Table 1), in hourly doses over a 5-h period, it was seen that the effect was 65% in the first hour and was maintained at approximately 60%, when compared to the control group, which was treated solely with carrageenan. When FBP was administered orally, it was seen that the effect was similar to that seen with intraperitoneal administration in the first hour, with the value decreasing progressively over the 5-h period (Fig. 5). It is possible that bisphosphorylated sugar is more easily excreted when administered orally and, in single doses, may not have the same degree of anti-inflammatory effectiveness.

The anti-inflammatory effect of FBP, when administered intraperitoneally, confirms the positive protective effect against cellular lesion of bisphosphorylated sugar. Uptil now FBP has been used in a variety of experimental treatments, such as in cases of acute myocardial infarction [34], hypoglycaemia [35], renal ischemia [36], and cerebral ischemia [18,37,38].

Our results may indicate the mechanisms by which FBP impeded the mortality of 50% of the animals following septic induction. What is more, FBP increased the survival of the animals, given that only 20% of them died in the first 15 h, 10% in 24 h, and 20% in 48 h (Nunes and coworkers, in press) The remaining animals were observed for a further 20 days during which time no more deaths occurred. This data proves the validity of using FBP in the treatment of sepsis and furthermore, suggests its protective response is probably due to an anti-inflammatory rather than antimicrobial action.

References

- Creteur J, Vicente JL. Hemoglobin solutions: an "all-in-one" therapeutic strategy in sepsis? *Crit Care Med* 2000;28:894–6.
- Davies MG, Hagen PO. Systemic inflammatory response syndrome. *J Surg* 1997;84:920–35.
- Groeneveld ABC, Kester ADM, Nauta JJP. Relation of arterial blood lactate to oxygen delivery and hemodynamic variables in human shock states. *Circ Shock* 1987;22:35–53.
- Meirangolo L, Fiorillo M, Friedman G, et al. Early hemodynamic course of septic shock. *Crit Care Med* 1995;23:1931–75.
- Benjamin E, Leibowitz AB, Oropello J, Iberti TJ. Systemic hypoxic and inflammatory syndrome: an alternative designation for "sepsis syndrome". *Crit Care Med* 1992;20:680–2.
- Mammen EF. The haematological manifestation of sepsis. *J Antimicrob Chemother* 1989;41:17–24.
- Schweighoffer T, Shaw S. Adhesion cascades: diversity through combinatorial strategies. *Curr Opin Cell Biol* 1992;4:824–9.
- Service RF. Antibiotics that resistence. *Science* 1995;270:724–7.
- Bochud PY, Glauser MP, Calandra T. Antibiotics in sepsis. *Intensive Care Med* 2001;27:S33–48.
- Markov AK. Hemodynamics and metabolic effects of fructose-1,6-diphosphate in ischemia and shock—experimental and clinical observations. *Ann Emerg Med* 1986;15:1470–7.
- 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;84:115–21.
- Kelleher JA, Chan PH, Chan TYY, Gregory GA. Energy metabolism in hypoxic astrocytes: protective mechanism of fructose-1,6-bisphosphate. *Neurochem Res* 1995;20:785–92.
- Markov AK, Oglethorpe NC, Terry J, Grogan JB, Hallem HK. Hemodynamic, electrocardiographic, and metabolic effects of fructose diphosphate on acute myocardial ischemia. *Am Heart J* 1980;100:639–46.
- Rao SB, Mehendale HA. Protective role of fructose-1,6-bisphosphate during CCl₄ hepatotoxicity in rats. *Biochem J* 1989;262:721–5.
- Oliveira JR, Rosa JL, Ambrosio S, et al. Effect of galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism: protective role of fructose-1,6-bisphosphate. *Hepatology* 1992;15:1147–53.
- Takeuchi K, Cao-dawh H, Friets J, 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 postischemia heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;116:335–43.
- Herrero I, Tomas J, Carrera M, Castells A, Pasto L, Gil-velmet S, et al. Evaluation of a preservation solution containing fructose-1,6-diphosphate and mannitol using the isolated perfused rat kidney. Comparison with Euro-Collins and University of Wisconsin Solution. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:519–26.
- Farias LA, Smith EE, Markov AK. Preservation of ischemic-hypoxic brain injury and death in rabbits with fructose-1,6-diphosphate. *Stroke* 1990;21:606–13.
- 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;64:1463–8.
- Sun J, Farias LA, Markov AK. Fructose-1,6-diphosphate prevents intestinal ischemic reperfusion injury and death in rats. *Gastroenterology* 1990;98:117–21.
- Gregory GA, Yu ACH, Chan PH. Fructose-1,6-bisphosphate protects astrocytes from hypoxic damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:29–34.
- Klouček E, Markov M, Popov A. A pharmacological study of the hepatoprotective activity of fructose-1,6-diphosphate. *EKSP Med Morphol* 1993;31:60–71.
- Roig T, Bartrons R, Bermudez J. Exogenous fructose-1,6-bisphosphate reduces K⁺ permeability in isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1997;273:473–8.
- Nunes FB, Oliveira JR, Pires MGS, Wächter PH. Septic induction in rats (Wistar): experimental model. *Revista de Medicina da PUCRS* 2000;10:183–7.
- Bier O. *Microbiologia e imunologia*. 24th ed. São Paulo: Melhoramentos; 1985. p. 999–1001.
- Antunes GS. *Manual de diagnóstico bacteriológico*. 2nd ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 1995.
- Vandepitte J, Engbaek K, Piot P, Heuck CC. *Procedimentos laboratoriais em bacteriologia clínica*. 2nd ed. São Paulo: Santos; 1997.
- Nunes FB, Oliveira JR. Analysis of rats peripheral blood submitted to sepsis and treated with fructose-1,6-bisphosphate. *Biociências* 1998;6:57–69.
- Robertson AB, Schwartz B. Ascorbic acid and the formation of collagen. *J Biol Chem* 1953;201:689–96.

- [30] Benitz KF, Hall LM. Local morphological response following a single subcutaneous injection of carragenin in the rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1959;102:442–5.
- [31] Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962;111:544.
- [32] Farber JL, Young EE. Accelerated phospholipid degradation in anoxic rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 1989;221:312–20.
- [33] 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;83:584–93.
- [34] Lazzarino G, Viola AR, Muliere L, Rotilio G, Mavelli I. Prevention by fructose-1,6-bisphosphate of cardiac oxidative damage induced in mice by subchronic doxorubicin treatment. *Cancer Res* 1987;47:6511–6.
- [35] Farias LA, Sun J, Markov AK. Improved brain metabolism with fructose-1,6-diphosphate during insulin-induced hypoglycemic coma. *Am J Med Sci* 1989;296:294–9.
- [36] Didlake R, Kirchner KA, Lewin J, Bower JD, Markov A. Protection from ischemic renal injury by fructose-1,6-diphosphate infusion in the rats. *Circ Shock* 1985;16:205–12.
- [37] Marchionni N, Conti A, Alfieri W, Bari M, Ferrucci L, Lombardi A, et al. Hemodynamic and electrocardiographic effects on fructose-1,6-diphosphate in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1985;56:266–9.
- [38] Grandi AM, Moggia C, Barzussa F, Venco A, Finardi G. Improved left ventricular function after short-term treatment with fructose-1,6-diphosphate: echocardiographic study in chronic ischemic heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin Ther* 1988;10:372–80.

AVALIAÇÃO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO COMO AGENTE ANTIMICROBIANO E ANTIINFLAMATÓRIO NA SEPSE.

Fernanda Bordignon Nunes, Cássio Meyer Graziottin, José Carlos Farias Alves Filho, Adroaldo Lunardelli, Melissa Guerra Simões Pires, Paulo Harald Wächter & Jarbas Rodrigues de Oliveira.

RESUMO

Apesar dos esforços terapêuticos, a sepse permanece como a maior causa de mortalidade hospitalar. O presente trabalho visou a busca de drogas alternativas que diminuam a morbidade e a mortalidade decorrente do processo séptico, levando em consideração que, grande parte dos mecanismos de lesão tecidual provocados pela sepse incluem o processo infeccioso, inflamatório e o déficit de energia celular. Dentre estas drogas, utilizou-se a Frutose-1,6-bisfosfato por sua possível ação antiinflamatória e antimicrobiana. Utilizou-se ratos Wistar, divididos em três grupos experimentais. Um grupo controle (n=10) onde foi introduzida uma cápsula no peritônio dos animais; um grupo séptico (n=10) onde foi introduzida uma cápsula com conteúdo fecal não estéril e *E. coli* ($1,5 \times 10^9$ C.F.U.); e um grupo séptico tratado com a Frutose-1,6-bisfosfato 500 mg/kg (n=10). Para testar a validade da droga como antiinflamatório e antimicrobiano, foi realizado hemograma, hemocultura, antibiograma, injeção subcutânea de carragenina (tratamento com Frutose-1,6-bisfosfato por via oral e intraperitoneal) e determinação de cálcio iônico. A análise dos hemogramas revelou que leucócitos totais estavam mais elevados no grupo séptico, comparados ao controle e ao grupo tratado. As hemoculturas foram 100% positivas para *E. coli* nos grupos séptico e séptico tratado com o açúcar bisfosforilado. O antibiograma apresentou um halo de inibição somente para o antibiótico ampicilina, não apresentando esse indicativo para a Frutose-1,6-bisfosfato. O poder antiinflamatório da Frutose-1,6-bisfosfato (por via intraperitoneal) foi mantido cerca de 60%, durante 5 horas nos ratos que receberam injeção de carragenina. Além disso, o açúcar diminuiu, com relação ao grupo controle, o cálcio iônico. Sugere-se que a Frutose-1,6-bisfosfato tem validade no tratamento da sepse experimental, possivelmente pela sua ação antiinflamatória e não antimicrobiana, pois a mesma não impediu a proliferação bacteriana,

mas diminuiu a mortalidade dos ratos durante o quadro agudo da doença e aumentou o tempo de sobrevivência dos animais.

PALAVRAS-CHAVES: Sepses, Frutose-1,6-bisfosfato, inflamação, antimicrobiano.

INTRODUÇÃO

A disfunção da microcirculação é, reconhecidamente, o mais significativo componente da lesão celular na sepse (1). As alterações hemodinâmicas que ocorrem durante o curso clínico do choque séptico, se devem as endotoxinas liberadas pelas bactérias, que induzem uma seqüência de alterações inflamatórias, incluindo a ativação de células efetoras e a liberação de uma infinidade de mediadores, entre eles as citocinas, moléculas de adesão, fatores de ativação das plaquetas e óxido nítrico (NO) (2). Estes eventos determinam o aumento da permeabilidade capilar e vasodilatação, provocando edema intersticial, contribuindo assim para diminuir o aporte de oxigênio para os tecidos (1). Ocorre então, o predomínio da glicólise anaeróbica, com aumento de ácido láctico (acidose láctica) e dano celular (3).

Como conseqüência do aumento da permeabilidade vascular, ocorre aumento da concentração dos elementos figurados do sangue (hemoconcentração) aumentando assim, a viscosidade sangüínea. Estes eventos provocam uma progressiva queda da velocidade da circulação e a área inflamada passa a ser mal oxigenada (4). Ocorrem fenômenos que deprimem a produção de energia celular e, como conseqüência, dá-se a queda dos níveis energéticos. Esta queda pode provocar a morte celular (5).

Este sistema leva a uma mobilização da reserva medular caracterizando-se pelo aumento dos leucócitos bastonados (6), levando a uma adesão endotelial destas células que dependem da carga do endotélio e também do íon cálcio (Ca^{++}) (7).

Apesar dos esforços terapêuticos, a sepse permanece como a maior causa de mortalidade hospitalar, principalmente nas unidades de terapia intensiva. A gravidade da sepse

pode estar associada também, ao uso indiscriminado e maciço de antibióticos os quais, em dosagens e administrações inadequadas, podem potencializar a ação de microorganismos, agravando o quadro inflamatório. Os antibióticos são vítimas de sua própria força evolucionária quando usados em grande escala, e seu uso indiscriminado seleciona bactérias que sobrevivem por criarem resistência à eles (8,9).

O presente trabalho visou a busca de drogas alternativas que minimizassem a morbidade e a mortalidade decorrente do processo séptico levando em consideração que, grande parte dos mecanismos de lesão tecidual provocados pela sepse incluem o processo infeccioso, inflamatório e o déficit de energia celular (10). Dentre essas drogas está a Frutose-1,6-bisfosfato (FBP) que, tem sido reportada, como uma substância que exerce efeitos terapêuticos em várias situações patológicas como isquemia, choque e lesões tóxicas (11-14). Os efeitos benéficos da Frutose-1,6-bisfosfato tem sido documentados nas disfunções cardíacas, renais, cerebrais, hepáticas e intestinais (intestino delgado) (15,23). Recentemente foi demonstrado que o uso da FBP em animais sépticos reduziu a mortalidade em 50% (Nunes and cols. in press) Os efeitos do açúcar bisfosforilado têm sido atribuídos a sua habilidade de manter os níveis de ATP quando a célula está sob estresse, porém os mecanismos celulares desta ação ainda não estão claros (23). Examinou-se o papel da Frutose-1,6-bisfosfato como uma possível opção terapêutica em ratos submetidos a sepse, pela sua provável ação antiinflamatória e antimicrobiana.

MATERIAL E MÉTODOS

TRATAMENTO COM A FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO

Os animais foram manipulados de acordo com o “Guiding Principles in the Care and Use of Animals” aprovado pelo Conselho da Sociedade de Fisiologia Americana. Foram

utilizados ratos Wistar, machos, pesando 250 à 350 gramas, sujeitos a um ciclo de 12 horas claro/escuro. Os animais foram divididos em três grupos, contendo 10 animais cada, anestesiados com 50 mg/kg *ip* de pentobarbital. O abdômen de cada animal foi limpo com solução de álcool iodado. Foi realizada uma incisão de 2 cm a partir da linha alba. Em um grupo foi induzida a sepse introduzindo-se *ip* uma cápsula de agar com conteúdo fecal e suspensão de *Escherichia coli*. A concentração da suspensão de *E. coli* foi medida em espectrofotômetro (650 nm), resultando uma D.O entre 1.180 e 1.200, o que rendeu um total de $1,5 \times 10^9$ C.F.U (Unidades Formadoras de Colônia/ ml) (24).

Em outro grupo foi induzida a sepse e os animais tratados via *ip* no momento da indução com a Frutose-1,6-bisfosfato (Sigma Chemical Co.) 500 mg/Kg. No grupo controle foi introduzida uma cápsula de agar vazia na cavidade peritonial.

Foram considerados viáveis os indivíduos que sobreviveram após 15 horas da indução séptica. Este intervalo foi determinado tomando-se como parâmetro os animais sépticos não tratados uma vez que todos morreram neste período.

HEMOCULTURA

Para verificar se a FBP possui ação antimicrobiana no tratamento da sepse, foi realizada hemocultura dos animais sépticos tratados com essa droga. Retirou-se cerca de 1mL de sangue de cada animal. O sangue foi depositado em um frasco com caldo nutriente. Após este procedimento os frascos foram levados a estufa em temperatura de 37° C por 24 horas. A análise do crescimento bacteriano foi realizado de acordo com a turbidez e formação de película no caldo nutriente (Becton Dicknson). As hemoculturas positivas foram analisadas para determinação dos microorganismos. O período de incubação das hemoculturas foi de seis

dias (25) e posteriormente foram repicadas do caldo de cultura para as placas de petri divididas em “hemi & azida” (meio de cultura sólido – Merck).

ANTIBIOGRAMA

Para avaliar os reais efeitos do açúcar bisfosforilado frente à população bacteriana, tendo em vista sua possível ação protetora frente ao quadro séptico, foi realizado um antibiograma. Em placas de Petri, fez-se a replicação da bactéria *Escherichia coli* originada de uma cultura de concentração ideal de $1,8 \times 10^8$ microorganismos/mL - 0,6 na Escala de Mac Farland - (26) e outra cultura de concentração 2,0 na escala Mac Farland, que foram mantidas por um meio de cultura ágar Mueller Hinton (método modificado de Kirby-Bauer) (27) e incubadas por 24 horas em estufa a 37° C.

A solução de FBP, 294 mM (concentração determinada com base na dose utilizada no tratamento dos ratos sépticos), foi adicionada em disco estéril de antibiograma. Para amostra controle, que também foi submetida ao disco, foi utilizada água destilada representando a matriz da solução do açúcar. Outra amostra foi submetida à ação do antibiótico ampicilina 10µg, cujo poder antibacteriano é inquestionável para *E. coli*. O resultado foi verificado 24 horas após o procedimento e avaliado conforme a presença ou ausência de um halo de inibição.

HEMOGRAMA

Para análise dos parâmetros hematológicos, foram coletadas amostras de sangue dos animais, 12 horas após os procedimentos de cada grupo experimental, retirando-se 1 ml de sangue através de punção cardíaca (28). Foi utilizado contador automático (Coulter STKS) e contagem manual (diferencial) em microscopia óptica.

EFEITO ANTINFLAMATÓRIO

A injeção subcutânea de carragenina produz nos ratos um edema inflamatório (29,30) que pôde ser medido nas patas traseiras dos ratos (31).

Os ratos foram divididos em dois grupos: um grupo controle (n=10) que recebeu uma injeção *ip* de NaCl (0,9%) 30 minutos antes do tratamento com carragenina (tipo IV – Sigma), e outro grupo (n=10) que recebeu 500 mg/kg de FBP nas mesmas condições que o grupo controle. A carragenina (30 ml) foi diluída em 3 ml de água destilada, aproximadamente 1 hora antes da injeção e, em seguida, administrou-se 0,05 desta solução nas patas direitas traseiras de cada rato. Os volumes das patas foram determinados antes do tratamento (valor basal) e, posteriormente, a cada hora depois do tratamento. Comparou-se a medida da pata dos animais tratados com o açúcar e os não tratados (efeito inflamatório 100 %) os resultados foram expressos pela porcentagem de inibição. A extensão da resposta inflamatória foi registrada pela medida do volume da pata direita traseira (Pletismógrafo Ugo Basile 7150) antes (V0) e depois (V1) da administração de carragenina.

$$\% \text{ inflamação (I)} = \frac{V1 - V0}{V0} \times 100$$

Para verificar se era mantido o efeito antiinflamatório da Frutose-1,6-bisfosfato por um tempo maior e, em níveis aceitáveis, administrou-se por via intraperitoneal em intervalos de 1 hora, 500 mg/kg do açúcar bisfosforilado. Esta metodologia foi utilizada durante 5 horas. A administração por via oral foi realizada em dose única 500 mg/kg, minutos antes da injeção de carragenina.

DETERMINAÇÃO DO CÁLCIO IÔNICO EM SOLUÇÕES

O cálcio está envolvido em processos inflamatórios, como um agente quimiotático para leucócitos, além disso, muitos autores relacionam a presença desse íon em mecanismos de lesão celular (32). Para verificar se a Frutose-1,6-bisfosfato exerce algum efeito sobre o cálcio extracelular, determinou-se o cálcio iônico em diferentes soluções. Utilizou-se 5mM e 10mM de Frutose-1,6-bisfosfato, 5mM de EGTA (um potente quelante de cálcio) e a solução controle de Krebs-Ringer. Dissolveu-se 2,5 mM de cloreto de cálcio em solução Krebs-Ringer bicarbonato, pH 7,4. Em seguida mediu-se a concentração de cálcio iônico através de um eletrodo seletivo em um Radiometer (ISA).

Para análise estatística foi empregado o teste de Fischer. Para confecção dos gráficos, utilizou-se a média e o desvio padrão de cada grupo.

RESULTADOS

Hemoculturas: o percentual de positividade das hemoculturas do grupo controle foi zero e, a positividade do grupo séptico e do grupo tratado com a Frutose-1,6-bisfosfato foi de 100%. Todas as culturas do grupo séptico, bem como as do grupo séptico tratado, apontaram somente a presença de *E. coli* nas amostras de sangue coletadas. A figura 01 relaciona o percentual de positividade das hemoculturas dos grupos experimentais.

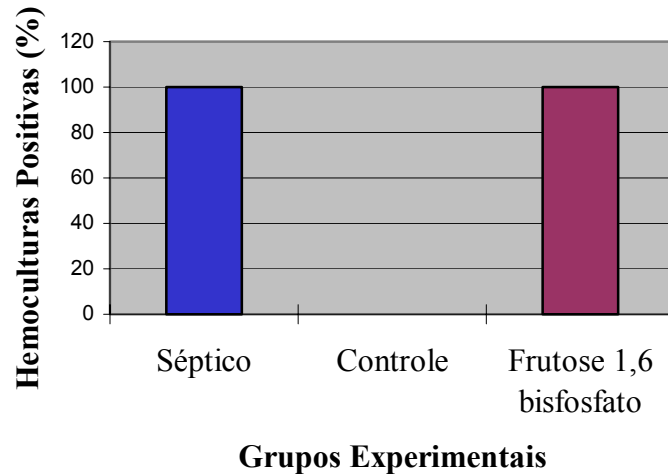


Figura 01 - Percentual de hemoculturas positivas nos grupos experimentais.

Antibiograma: o grupo controle (bactérias incubadas com água destilada) não apresentou resistência à proliferação bacteriana (não houve halo de inibição) assim, não agiu como uma substância antimicrobiana (fig. 02-a); as placas incubadas com a solução de Frutose- 1,6- bisfosfato não apresentaram qualquer halo inibitório ao crescimento de *E. coli* (fig. 02-b); as culturas bacterianas de *E. coli* incubadas com o antibiótico ampicilina 10 µg apresentaram um visível halo de inibição (~27mm) (fig. 02-c), caracterizando claramente sua eficiente ação como agente lesivo à população dos microorganismos.

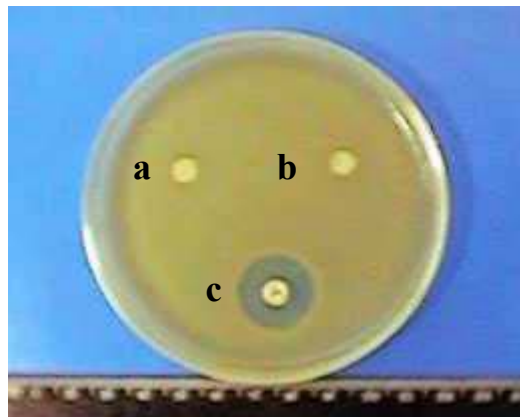


Figura 02 – Cultura de *E. coli* após incubação de 24 horas. (a) água destilada, ausência de inibição; (b) frutose-1,6-bisfosfato, ausência de inibição (c) ampicilina 10 µg, visível halo de inibição;

Hemogramas: os resultados dos hemogramas nos grupos experimentais em estudo (controle, séptico e séptico tratado com a Frutose-1,6-bisfosfato) estão representados pela figura 03 (onde são indicadas as médias e os desvios padrões destes valores).

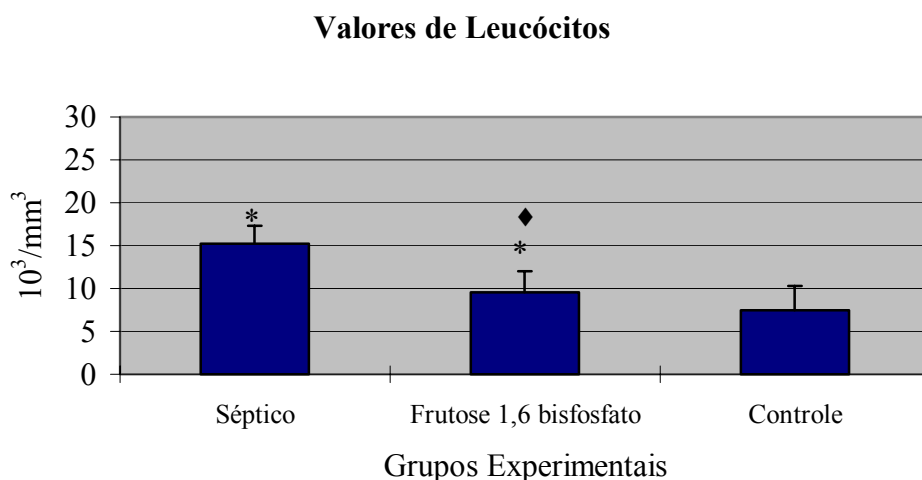


Figura 03 - Médias e desvios padrões dos valores de leucócitos nos grupos experimentais. As diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e os grupos séptico e Frutose-1,6-bisfosfato são indicadas por * ($P < 0,05$) e, entre o grupo séptico e o da Frutose-1,6-bisfosfato, são indicadas por ♦ ($P < 0,05$).

Observou-se que os valores da contagem de leucócitos (fig. 03) apresentaram-se mais elevados no grupo séptico comparados ao grupo séptico tratado e ao controle. Isto pode estar relacionado ao aumento dos bastonados no grupo séptico que indica a instalação de um quadro inflamatório provocado pela sepse.

Ação antiinflamatória: para verificar se a Frutose-1,6-bisfosfato exerce ação antiinflamatória, administrou-se via intraperitoneal e em intervalos de 1 hora, 500 mg/kg do açúcar bisfosforilado. Essa metodologia foi utilizada durante 5 horas, verificando-se que o poder

antiinflamatório é mantido cerca de 60% durante o período estudado. Esses resultados estão representados na figura 04 e tabela 01.

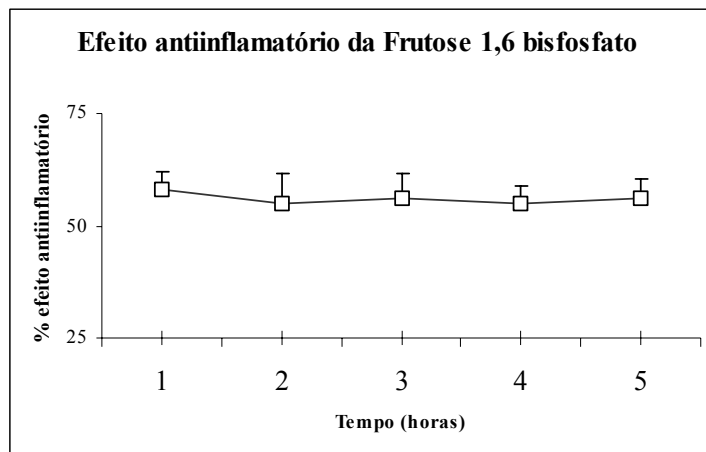


Figura 04 - Efeito antiinflamatório da administração continuada de FBP

Tabela 01 – Efeito antiinflamatório da Frutose-1,6-bisfosfato em edema de pata de rato induzido por carragenina.

Grupo	Volume do edema (mL)				
	Até 1h	Até 2h	Até 3h	Até 4h	Até 5h
Controle	0.90 ± 0.06	1.05 ± 0.05	0.79 ± 0.02	0.68 ± 0.02	0.58 ± 0.01
FBP	0.31 ± 0.03*	0.44 ± 0.04*	0.31 ± 0.03*	0.27 ± 0.02*	0.21 ± 0.01*
% Inibição	65.5	58.1	60.7	60.2	63.0

A Frutose-1,6-bisfosfato (500 mg/kg) foi administrada intraperitonealmente em intervalos de 1 h. O volume da pata foi medido nos tempos indicados. Cada valor representa a média ± E.P. para um grupo de oito a dez observações.* (P<0.01); as diferenças significativas entre os grupos tratados com a droga e os controles foram comparados pelo Student's *t*-teste.

A administração oral (dose única) de 500 mg/kg do açúcar apresenta uma potência antiinflamatória de 60%, 1 hora depois de sua administração, diminuindo posteriormente. Estes resultados são mostrados na figura 05.

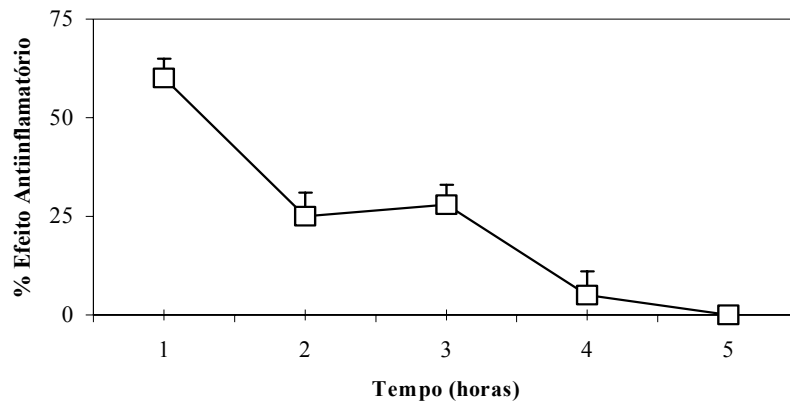


Figura 05 – Efeito antiinflamatório da administração oral de FBP

Ação da Frutose-1,6-bisfosfato sobre a concentração de cálcio iônico: para verificar se o açúcar bisfosforilado poderia ter um efeito antiinflamatório através da diminuição do cálcio iônico extracelular, verificou-se a sua capacidade em diminuir esse íon. Na tabela 02 é demonstrado que a Frutose-1,6-bisfosfato diminuiu a concentração desse íon em relação ao controle.

Tabela 02 – Efeito da Frutose-1,6-bisfosfato e EGTA sobre a concentração de cálcio iônico em solução.

		Cálcio iônico (mMol/L)
Controle		2,00
FBP	5mM	1,32
FBP	10mM	1,02
EGTA	5mM	0,05

O cálcio iônico foi determinado conforme já descrito no material e métodos. O íon foi dissolvido em Krebs-Ringer pH=7,4. Sua concentração final foi de 2,5 mM.

DISCUSSÃO

Os resultados revelaram que a mortalidade dos animais sépticos tratados com a Frutose-1,6-bisfosfato foi reduzida para 20% em 15 horas, sendo que no grupo séptico não tratado este

percentual atingiu 100%. Estes dados revelam que por algum mecanismo, o açúcar bisfosforilado atuou no processo séptico impedindo a mortalidade dos animais. Uma das hipóteses, é de que a Frutose-1,6-bisfosfato poderia atuar como antibacteriano, evitando assim que o processo irreversível da sepse fosse desencadeado. Esta idéia foi descartada pela positividade de 100% das hemoculturas no grupo experimental tratado com a Frutose-1,6-bisfosfato e, também, pelo resultado do antibiograma, onde o açúcar não teve ação antimicrobiana na concentração proposta. Logo, o mecanismo pelo qual, a Frutose-1,6-bisfosfato impediu a mortalidade dos animais deve ter sido outro.

Uma das possíveis propriedades da Frutose-1,6-bisfosfato é agir como antiinflamatório. Com base nesta afirmação acreditou-se que a Frutose-1,6-bisfosfato agiria atenuando ou até mesmo bloqueando a resposta inflamatória. A investigação dos elementos figurados do sangue nos grupos experimentais tornou-se imprescindível para o estabelecimento das variáveis que corroborassem com esta teoria.

Os níveis de leucócitos apresentaram-se mais elevados no grupo séptico comparados aos sépticos tratados com o açúcar bisfosforilado e ao controle. A redução dos níveis de leucócitos no grupo séptico tratado com a Frutose-1,6-bisfosfato representa uma diminuição do influxo dos mesmos na circulação sistêmica. Estes elementos estão envolvidos em menor ou maior intensidade no processo inflamatório. Segundo MAMMEN (6) no processo séptico há o predomínio das formas em bastão na circulação, situação esta denominada desvio à esquerda. No grupo tratado com a Frutose-1,6-bisfosfato o nível de bastonados apresentou-se reduzido em relação ao grupo séptico. Esta redução pode estar implicada na diminuição ou mascaramento dos sinais oriundos de mediadores químicos locais que estimulam a quimiotaxia dos neutrófilos. Esses sinais estão associados à adesão de células endoteliais e leucócitos que,

para ocorrerem, necessitam do cálcio extracelular. HASSINEN et al. (33) demonstraram que a Frutose-1,6-bisfosfato poderia diminuir significativamente o cálcio iônico em soluções, sugerindo que o mecanismo de ação do açúcar era através da diminuição extracelular desse íon. De acordo com essa hipótese, verificou-se se essa teoria se aplicava ao nosso modelo experimental. Como foi constatado na tabela 01, a Frutose-1,6-bisfosfato mostrou-se um quelante de cálcio, pois os valores desse íon mantiveram-se abaixo, quando comparados aos valores controles, e isto supostamente poderia impedir ou diminuir a quimiotaxia ou aderência dos neutrófilos.

Os monócitos, que estão em níveis mais elevados no grupo séptico, representam a primeira linha de defesa tecidual contra agentes estranhos. O aumento destes monócitos no grupo séptico implicam em alto estímulo na migração dos mesmos pela liberação das endotoxinas. A Frutose-1,6-bisfosfato parece atenuar esta resposta sistêmica.

Alguns autores já sugeriram que a FBP poderia ter uma ação antiinflamatória. Por esse motivo decidiu-se demonstrar no sistema experimental proposto se esse açúcar bisfosforilado apresentava realmente esse efeito.

Utilizando-se uma dose de 500 mg/kg de peso em doses continuadas de hora em hora, verificou-se que o efeito foi de 65% na primeira hora, e se manteve aproximadamente por 60% durante 5 horas, comparado ao grupo controle tratado somente com carragenina. Quando administrou-se a FBP por via oral, verificou-se um efeito similar ao da administração intraperitoneal na primeira hora, caindo esse valor progressivamente até às 5 horas (fig.05). Possivelmente o açúcar bisfosforilado, seja mais facilmente excretado quando administrado por via oral e, em doses únicas de administração, não tenha um efeito antiinflamatório tão eficaz.

A ação antiinflamatória, via intraperitoneal, da Frutose-1,6-bisfosfato vem confirmar o efeito positivo protetor da lesão celular do açúcar bisfosforilado. Até agora, a Frutose-1,6-bisfosfato tem sido utilizada em diferentes tipos de tratamentos experimentais, tais como infarto agudo do miocárdio (34), coma hipoglicêmico (35), isquemia renal (36) e isquemia cerebral (18,37,38).

Nossos resultados podem sugerir como a Frutose-1,6-bisfosfato impediu a mortalidade de 50% dos animais após a indução séptica. Além disso, a Frutose-1,6-bisfosfato aumentou a sobrevivência dos animais, pois apenas 20% destes morreram em 15 horas, 10 % em 24 horas e 20 % em 48 horas. Os demais animais (50%) foram observados por um período superior a 15 dias e não chegaram ao óbito. Estes dados comprovam a validade do uso da Frutose-1,6-bisfosfato no tratamento da sepse, possivelmente pela sua ação antiinflamatória e não antimicrobiana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. J. Creteur, J.L. Vicente. Hemoglobin solutions: an "all-in-one" therapeutic strategy in sepsis? *Crit Care Med* 2000;28:894–896.
2. M.G. Davies, P.O. Hagen. Systemic inflammatory response syndrome. *J Surg* 1997;84:920–935.
3. A.B.C. Groeneveld, A.D.M. Kester, J.J.P. Nauta. Relation of arterial blood lactate to oxygen delivery and hemodynamic variables in human shock states. *Circ Shock* 1987; 22:35–53.
4. L. Metrangolo, M. Fiorillo, G. Friedman *et al.* Early hemodynamic course of septic shock. *Crit Care Med* 1995;23:1931–1975.
5. E. Benjamin, A.B. Leibowitz, J. Oropello, T.J. Iberti. Systemic hypoxic and inflammatory syndrome: an alternative designation for "sepsis syndrome". *Crit Care Med* 1992;20:680–682.
6. E.F. Mammen. The haematological manifestation of sepsis. *J Antimicrob Chemother* 1989;41:17–24.

7. T. Schweighoffer, S. Shaw. Adhesion cascades: diversity through combinatorial strategies. *Curr Opin Cell Biol* 1992;4:824–829.
8. R.F. Service. Antibiotics that resistance. *Science* 1995;270:724–727.
9. P.Y. Bochud, M.P. Glauser, T. Calandra. Antibiotics in sepsis. *Intensive Care Med* 2001;27:S33–S48.
10. A.K. Markov. Hemodynamics and metabolic effects of fructose-1,6-diphosphate in ischemia and shock—experimental and clinical observations. *Ann Emerg Med* 1986;15:1470–1477.
11. Z. Vexler, M. Berrios, P.C. Ursell, A. Sola, D.M. Ferriero, G.A. Gregory. Toxicity of fructose-1,6-bisphosphate in developing normoxic rats. *Pharmacol Toxicol* 1999;84: 115–121.
12. J.A. Kelleher, P.H. Chan, T.Y.Y. Chan, G.A. Gregory. Energy metabolism in hypoxic astrocytes: protective mechanism of fructose-1,6-bisphosphate. *Neurochem Res* 1995;20:785–792.
13. A.K. Markov, N.C. Oglethorpe, J. Terry, J.B. Grogan, H.K. Hellem. Hemodynamic, electrocardiographic, and metabolic effects of fructose diphosphate on acute myocardial ischemia. *Am Heart J* 1980;100:639–646.
14. S.B. Rao, H.A. Mehendale. Protective role of fructose-1,6-bisphosphate during CCl₄ hepatotoxicity in rats. *Biochem J* 1989;262:721–725.
15. J.R. Oliveira, J.L. Rosa, S. Ambrosio *et al.* Effect of galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism: protective role of fructose-1,6-bisphosphate. *Hepatology* 1992;15:1147–1153.
16. K. Takeuchi, H. Cao-dawh, J. Friehs, P. Glynn, D. D'agostino, E. Simplaceanu *et al.* Administration of fructose-1,6-diphosphate during early reperfusion. significantly improves recovery of contractile function in the postischemia heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;116:335–343.
17. I. Herrero, J. Torras, M. Carrera, A. Castells, L. Pasto, S. Gil-vernet *et al.* Evaluation of a preservation solution containing fructose-1,6-diphosphate and manitol using the isolated perfused rat kidney. Comparison with Euro–Collins and University of Wisconsin Solution. *Nephrol. Dial Transplant* 1995;10:519–526.
18. L.A. Farias, E.E. Smith, A.K. Markov. Preservation of ischemic-hypoxic brain injury and death in rabbits with fructose-1,6-diphosphate. *Stroke* 1990;21:606–613.

19. P.E. Bickler, L.T. Buck. Effects of fructose-1,6-biphosphate on glutamate release and ATP loss from rat brain slices during hypoxia. *J Neurochem* 1996;64:1463–1468.
20. J. Sun, L.A. Farias, A.K. Markov. Fructose-1,6-diphosphate prevents intestinal ischemic reperfusion injury and death in rats. *Gastroenterology* 1990;98:117–121.
21. G.A. Gregory, A.C.H. Yu, P.H. Chan. Fructose-1,6-bisphosphate protects astrocytes from hypoxic damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:29–34.
22. E. Klouček, M. Markov, A. Popov. A pharmacological study of the hepatoprotective activity of fructose-1,6-diphosphate. *EKSP Med Morphol* 1993;31:60–71.
23. T. Roig, R. Bartrons, J. Bermudez. Exogenous fructose-1,6-bisphosphate reduces K^+ permeability in isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1997;273:473–478.
24. F.B. Nunes, J.R. Oliveira, M.G.S. Pires, P.H. Wächter. Septic induction in rats (Wistar): experimental model. *Revista de Medicina da PUCRS* 2000;10:183–187.
25. Bier O. *Microbiologia e imunologia*. 24th ed. São Paulo: Melhoramentos; 1985, p. 999–1001.
26. Antunes GS. *Manual de diagnóstico bacteriológico*. 2nd ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 1995.
27. Vandepitte J, Engbaek K, Piot P, Heuck CC. *Procedimentos laboratoriais em bacteriologia clínica*. 2nd ed. São Paulo: Santos; 1997.
28. F.B. Nunes, J.R. Oliveira. Analysis of rats peripheral blood submitted to sepsis and treated with fructose-1,6-bisphosphate. *Biociências* 1998;6:57–69.
29. A.B. Robertson, B. Schwartz. Ascorbic acid and the formation of collagen. *J Biol Chem* 1953;201:689–696.
30. K.F. Benitz, L.M. Hall. Local morphological response following a single subcutaneous injection of carragenin in the rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1959;102:442–445.
31. C.A. Winter, E.A. Risley, G.W. Nuss. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962;111:544.
32. J.L. Farber, E.E. Young. Accelerated phospholipid degradation in anoxic rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys* 1989; 221:312–320.
33. I.E. Hassinen, E.M. Nuutinen, K. Ito, S. Nioka, G. Lazzarino, B. Giardina et al. Mechanism of the effect of exogenous fructose-1,6-bisphosphate on myocardial energy metabolism. *Circulation* 1991;83:584–593.

34. G. Lazzarino, A.R. Viola, L. Muliere, G. Rotilio, I. Mavelli. Prevention by fructose-1,6-bisphosphate of cardiac oxidative damage induced in mice by subchronic doxorubicin treatment. *Cancer Res* 1987;47:6511–6516.
35. L.A. Farias, J. Sun, A.K. Markov. Improved brain metabolism with fructose-1,6-diphosphate during insulin-induced hypoglycemic coma. *Am. J Med Sci* 1989;296: 294–299.
36. R. Didlake, K.A. Kirchner, J. Lewin, J.D. Bower, A. Markov. Protection from ischemic renal injury by fructose-1,6-diphosphate infusion in the rats. *Circ Shock* 1985;16:205–212.
37. N. Marchionni, A. Conti, W. Alfieri, M. Bari, L. Ferrucci, A. Lombardi *et al.* Hemodynamic and electrocardiographic effects on fructose-1,6-diphosphate in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1985;56:266–269.
38. A.M. Grandi, C. Moggia, F. Barzuzza, A. Venco, G. Finardi. Improved left ventricular function after short-term treatment with fructose-1,6-diphosphate: echocardiographic study in chronic ischemic heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin Ther* 1988;10:372–380.

ARTIGO 2

Nunes FB, Graziottin CM, Alves-Filho JC, Lunardelli A, Caberlon E, Peres A, De Oliveira JR.

Immunomodulatory effect of fructose 1,6 bisphosphate on T-lymphocytes. *International*

Immunopharmacology 2003. 3:267-272

Immunomodulatory effect of fructose-1,6-bisphosphate on T-lymphocytes

Fernanda Bordignon Nunes^{a,*}, Cássio Meier Graziottin^a,
José Carlos Farias Alves Filho^a, Adroaldo Lunardelli^a,
Eduardo Caberlon^a, Alessandra Peres^b, Jarbas Rodrigues De Oliveira^a

^aLaboratório de Pesquisa em Biofísica, Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681-Prédio 12C-Sala 263-C.P. 1429, Porto Alegre, RS, Brazil

^bLaboratório de Imunogenética, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

Received 1 July 2002; received in revised form 20 September 2002; accepted 11 November 2002

Abstract

Sepsis remains an important and life-threatening problem, and is the most common cause of death in the intensive care unit. One promising therapeutic candidate for protection against injury in sepsis is fructose-1,6-bisphosphate (FBP), a high-energy glycolytic pathway intermediate. The objective of the study was to establish a role for FBP on the immune system, especially in lymphocyte proliferation. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from the blood of healthy humans by gradient centrifugation. T-lymphocytes were stimulated for 96 h with phytohemagglutinin (PHA) and varying concentration of FBP. Fructose-1,6-bisphosphate at concentrations between 1.2 and 10 mM decreased proliferation of T-lymphocytes and reduced the viability only at concentrations 5.0 and 10 mM. The levels of soluble IL-2 receptor were reduced at FBP concentrations between 1.2 and 10 mM. In conclusion, this study demonstrates that FBP has important effect on immunomodulatory and this result can be correlated with the protection against injury in sepsis.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Immunomodulation; Fructose-1,6-bisphosphate; T-lymphocyte; Soluble interleukin-2 receptor; Sepsis

1. Introduction

Sepsis is the systemic inflammatory response to infection [1]. Sepsis and its sequelae represent progressive stages of the same illness in which a systemic response to an infection mediated by endogenous mediators may lead to a generalized inflammatory reaction in organs remote from the initial insult and,

eventually, to end-organ dysfunction and/or failure [2]. Sepsis remains an important and life-threatening problem, and is the most common cause of death in the intensive care unit [3].

Evidence suggests a massive inflammatory reaction resulting from systemic cytokine release and this is a common pathway underlying sepsis [4]. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 (IL-1) are the first two cytokines involved in its pathogenesis [5]. Interferon- γ may act synergistically, increases interleukin-2 (IL-2) promotion of TNF- α release and promotes B-lymphocytes activation to increase anti-

* Corresponding author. Tel.: +55-51-3320-3500x4147; fax: +55-51-3320-3612.

E-mail address: fnunes@terra.com.br (F. Bordignon Nunes).

body production [6]. Many bacterial toxins cause IL-2 release from lymphocytes. IL-2, either alone or with the concomitant infusion of lymphokine-activated killer cells, has been given as a cancer therapy and the resulting toxicity has provided insight into septic shock [7]. Activation of resting T-lymphocytes induces the synthesis of IL-2 as well as the expression of specific surface receptors for this lymphokine. Both the production/secretion of IL-2 and the expression of IL-2 receptors are pivotal in the stimulated growth of T-lymphocytes [8].

One promising therapeutic candidate for protection against injury in sepsis is fructose-1,6-bisphosphate (FBP), a high-energy glycolytic pathway intermediate. In 1981, Markov et al. [9] reported that dogs injected intravenously with endotoxin from *Escherichia coli* had a survival rate of 90% if they were simultaneously given intravenous fructose-1,6-bisphosphate. Survival was 18% in dogs given endotoxin alone. Planas et al. [10] showed that the inflammatory action of carrageenan could be attenuated by administration of this sugar. In a recent work [11], we reported that the use of FBP impeded the death of 50% of the animals after septic induction. Fructose-1,6-bisphosphate increased the survival rate of the animals; only 20% of the treated animals died within 15 h, 10% in 24 h and 20% in 48 h. The other rats (50%) remained alive over the 15-day period that they were observed.

In studies reported here, we attempted to establish a role for FBP on the immune system, especially in lymphocyte proliferation, since immunological alterations associated with severe injury might contribute to a high risk of sepsis.

2. Material and methods

2.1. Reagents

RPMI 1640, Hanks' balanced salt solution, penicillin G (5000 U/ml), streptomycin (5000 µg/ml) and human AB serum were purchased from Life Technologies (Grand Island, NY). Lymphoprep was obtained from Nycomed Pharma (Oslo, Norway). Fructose-1,6-bisphosphate, phytohemagglutinin (PHA) and 3-[4-(5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were obtained from Sigma (St. Louis, MO).

2.2. Preparation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

The PBMCs were isolated from the blood of healthy humans by gradient centrifugation. A total of 20 ml of the heparinized blood was diluted 1:2 with serum-free Hanks' balanced salt solution. This mixture was overlaid in 7-ml partitions onto 3-ml Lymphoprep and centrifuged at $400 \times g$ at room temperature for 30 min. The PBMCs, including T-lymphocytes, were harvested from the interface with a sterile transfer pipette and washed twice in the serum-free Hanks' balanced salt solution. The cells were then resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 5% human AB serum at final cell density of 1.6×10^5 ml. Platelet contamination of these preparations was < 1%; viability by trypan blue dye exclusion was uniformly $\geq 99\%$.

2.3. Lymphoproliferation assay

Phytohemagglutinin was used for T-lymphocyte proliferation. Fructose-1,6-bisphosphate was dissolved in RPMI 1640. Peripheral blood mononuclear cells (1.6×10^5 cell/well) were plated directly with different concentrations of FBP ranging from 0.3 to 10 mM, which were cultured in the presence of mitogen (10 µg/ml, PHA) in 96-well microtiter plates (Coming, Coming, NY) at 37 °C in a 5% CO₂-humidified incubator for 96 h.

Lymphocyte proliferation was determined by MTT assay as previously described [12]. Briefly, MTT was dissolved in RPMI 1640 at 5 mg/ml and added to all wells of an assay, and plates were incubated at 37 °C for 4 h. Isopropanol was added to all wells and mixed thoroughly to dissolve the dark blue crystals. After a few minutes, the plates were read on a Hyperion MicroReader reader, using a test wavelength of 570 nm and a reference wavelength of 630 nm. The results are presented as optical density by mean \pm S.D. and all reactions were performed in quadruplicate.

2.4. Cytotoxicity assay

Fructose-1,6-bisphosphate was dissolved in RPMI 1640 and added directly to PBMCs (1.6×10^5 cell

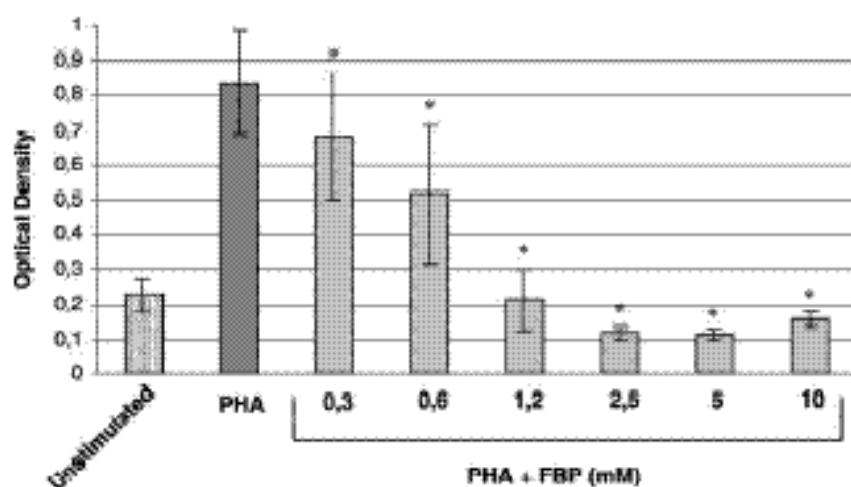


Fig. 1. Immunomodulatory effect of fructose-1,6-bisphosphate on T-lymphocytes stimulated with PHA. PBMCs were stimulated for 96 h with PHA and varying concentration of FBP. Proliferation was measured using colorimetric MTT assay. Results are expressed as optical density by mean \pm S.D. of quadruplicate cultures. An asterisk denotes any response that is significantly different ($P < 0.05$) from the control group (unstimulated).

well), which were incubated in 24-well microtiter plates (Corning) at 37 °C in a 5% CO₂-humidified incubator. The cellular viability was performed by trypan blue dye exclusion after 96 h of the incubation. The results are presented as percentage by mean \pm S.D. and all reactions were performed in quadruplicate.

2.5. Assay for soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R)

Levels of soluble interleukin-2 receptor were measured by ELISA, with the use of R&D Systems Kit (Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions. Culture supernatants were collected after 96 h of lymphoproliferation assay, centrifuged free of

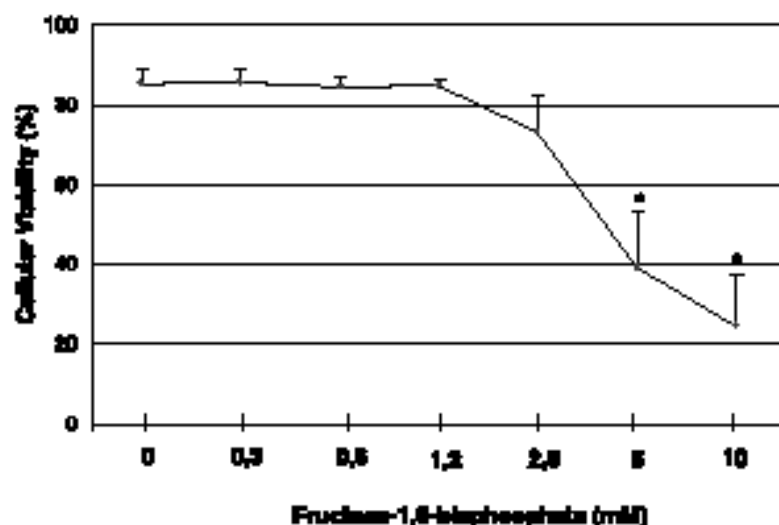


Fig. 2. Cytotoxicity effect of fructose-1,6-bisphosphate in PBMCs. PBMCs was incubated for 96 h with varying concentration of FBP. The cellular viability was performed by trypan blue dye exclusion. The results are presented as percentage by mean \pm S.D. of quadruplicate cultures. An asterisk denotes any response that is significantly different ($P < 0.05$) from the control group.

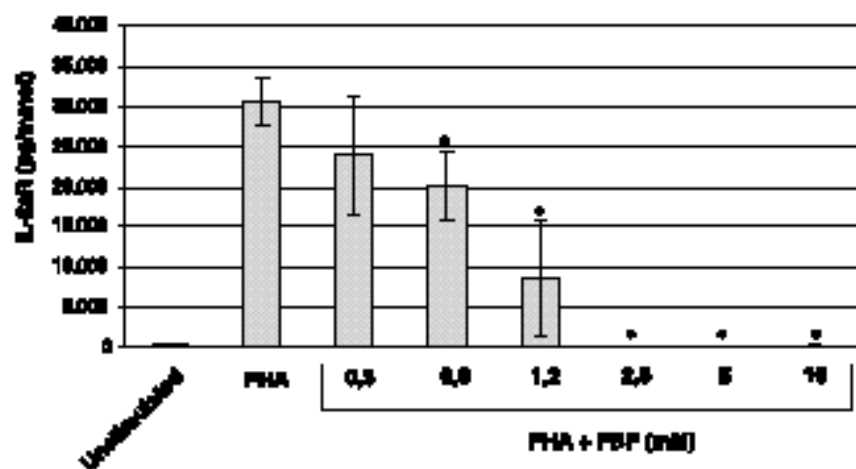


Fig. 3. Levels of soluble IL-2 receptors in the presence of fructose-1,6-bisphosphate. Culture supernatants were collected after 96 h of the lymphoproliferation assay. Soluble IL-2 receptor was determined by ELISA. Results are expressed as mean \pm S.D. An asterisk denotes any response that is significantly different ($P < 0.05$) from the control group (unstimulated).

debris and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until assayed. All standards and samples were tested in duplicate. The sIL-2R concentration was expressed in pg/ml.

2.6. Statistical analysis

Group differences were tested by one-way analysis of variance (ANOVA) using SPSS 9.0 for Windows (8.0). All results are expressed as means \pm S.D.; $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Immunomodulatory effect of fructose-1,6-bisphosphate on T-lymphocytes stimulated with PHA

We first evaluated the immunomodulatory effect of fructose-1,6-bisphosphate on proliferation of T-lymphocytes in vitro in the presence of PHA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Results presented in Fig. 1 show that FBP at concentrations between 1.2 and 10 mM significantly decreased proliferation of these cells ($P < 0.05$).

3.2. Cytotoxicity effect of fructose-1,6-bisphosphate on PBMCs

To determine whether the inhibitory effect of fructose-1,6-bisphosphate on lymphoproliferation

was due to cellular death, the cellular viability of FBP in PBMCs was investigated. As shown in Fig. 2, FBP significantly reduced the cell viability only at concentrations 5.0 and 10.0 mM ($P < 0.05$).

3.3. Levels of soluble IL-2 receptors in the presence of fructose-1,6-bisphosphate

To confirm the efficacy of the inhibitory effect of fructose-1,6-bisphosphate on lymphoproliferation, we measured the levels of sIL-2R at culture supernatants. As presented in Fig. 3, FBP significantly reduced the levels of soluble sIL-2R at concentrations between 1.2 and 10 mM ($P < 0.05$).

4. Discussion

The objective of this work was to investigate the potential effect of FBP on T-lymphocytes proliferation, since immunological alterations associated with severe injury might contribute to a high risk of sepsis. This study demonstrates that FBP has important effect on immunomodulatory. Increase concentrations of FBP were associated with a proportional reduction of T-lymphocytes proliferation. To determine whether the inhibitory effect of fructose-1,6-bisphosphate on lymphoproliferation was due to cellular death, the cellular viability of FBP in PBMCs

was investigated. As shown in Fig. 2, FBP significantly reduced the cell viability only at concentrations 5.0 and 10.0 mM.

To further investigate the mechanism responsible for the inhibitory effect on T-lymphocyte, the effect of FBP on the soluble IL-2 receptor was investigated. Interleukin-2, a lymphokine synthesized and secreted by lectin- or antigen-activated T-lymphocyte, is felt to exert its biological effects by interacting with specific high-affinity receptors on the surface of activated T-lymphocyte. In contrast to other hormone-mediated systems, cellular activation is a pre-requisite for the induction of both ligand (IL-2) and its receptor (sIL-2R), the latter being expressed rapidly at the cell surface in a time-dependent and heterogeneous manner. Such soluble IL-2 receptor may serve an immunoregulatory role in cell growth and differentiation [13]. Although there was change in cell viability, fructose-1,6-bisphosphate showed an inhibitory effect on T-lymphocyte function and sIL-2R expression. It has been reported that IL-2 is a multifunctional Th1-cytokine expressed by activated T-lymphocyte that facilitates T-lymphocyte proliferation and helps to regulate the actions of a variety of other cell types [14]. IL-2 is closely related to the immune network and the inhibition of this cytokine by FBP can affect the immune system. The concentration of soluble IL-2 receptors was reduced in doses of 1.2, 2.5, 5.0 and 10.0 mM, but only 1.2 and 2.5 mM were effective concentrations of FBP for the inhibition of proliferation and cytokine expression, since the 5.0 and 10.0 mM concentrations were cytotoxic.

Fructose-1,6-bisphosphate chelates calcium (Ca^{2+}) and reduces ionized calcium proportional to the FBP concentration [15]. Indeed, Ca^{2+} uptake is reduced in both myocardial tissue and spermatozoa in the presence of FBP [16]. We believe that mechanism by which FBP decreases the IL-2 release and the lymphocyte proliferation includes the downregulation of Ca^{2+} influx, but the specific nature of the effect remains unknown.

Another possible explanation could be that the FBP interacted with cell membranes, modifying the ion permeability. In the presence of FBP, the passive and active K^+ effluxes in hepatocytes decreased [17]. The conductance of the membrane to K^+ is a major determinant of T-lymphocyte transmembrane potential. Changes in transmembrane electrical potential are

suggested to be important early events in lymphocyte mitogenesis [18]. K^+ channel blockers inhibit IL-2 production and lectin-induced T-lymphocyte proliferation at concentrations that block K^+ conductance [19].

In conclusion, the results reported here suggest the immunomodulatory effect of FBP as has been shown in T-lymphocyte proliferation and this results can be correlated with the protection against injury and shock septic.

References

- [1] Matot I, Sprung CL. Definition of sepsis. *Intensive Care Med* 2001;27:S3–9.
- [2] Bone RB, Grodzin CG, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1998;112:235–43.
- [3] Parrillo JE, Parker MM, Natanson C. Septic shock, advances in understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990;113:227–42.
- [4] Walley KR, Lofnes NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunikl SL. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun* 1996;64:4733–8.
- [5] Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997;112:321S–9S.
- [6] Dinarello CA. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. *J Infect Dis* 1991;163:1177–84.
- [7] Dal Nogare AR. Septic shock. *Am J Med Sci* 1991;302:50–65.
- [8] Gelfand EW, Mills GB, Chong RK, Lee JWW, Grinstein S. Transmembrane ion fluxes during activation of human T-lymphocytes: role of Ca^{2+} , Na^+/H^+ exchange and phospholipid turnover. *Immunol Rev* 1987;95:59–87.
- [9] Markov AK, Turner MD, Ogletrope NC. Fructose-1,6-diphosphate: an agent for treatment of experimental endotoxin shock. *Surgery* 1981;90:482–8.
- [10] Planas ME, Sánchez S, González P, Oliveira JR, Bantoux R. Protective effect of fructose-1,6-bisphosphate against carrageenan-induced inflammation. *Eur J Pharmacol* 1993;237:251–5.
- [11] Nunes FB, Pires MGS, Alves Filho JCE, Wichter PH, Oliveira JR. Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose-1,6-bisphosphate as cellular protection. *Crit Care Med* 2002;30:2069–74.
- [12] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
- [13] Rubin LA, Nelson DL. The soluble interleukin-2 receptor: biology function and clinical application. *Ann Intern Med* 1990;113:619–27.
- [14] Smith KA. Interleukin-2: inception, impact and implications. *Science* 1988;240:1169–76.

- [15] Hassinen IE, Nuutinen EM, Ro K, Niola S, Lazzarino G, Giardina B, et al. Mechanism of the effect of exogenous fructose-1,6-bisphosphate on myocardial energy metabolism. *Circulation* 1981;83:584–93.
- [16] Galzigna L, Rizzoli V, Bianchi M, Rigobello MP, Scuri R. Some effects of fructose-1,6-bisphosphate on rat myocardial tissue related to a membrane-stabilizing action. *Cell Biochem Funct* 1989;7:91–6.
- [17] Roig T, Barrios R, Bermúdez J. Exogenous fructose-1,6-bisphosphate reduces K^+ permeability in isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1997;273:C473–8.
- [18] Grinstein S, Clarke CA, DuPre A, Rothstein A. Volume-induced increase of anion permeability in human lymphocytes. *J Gen Physiol* 1982;80:801–23.
- [19] Chandy KG, DeCoursey TE, Cahalan MD, McLaughlin C, Gupta S. Voltage gated potassium channel required for human T-lymphocyte activation. *J Exp Med* 1984;160:369–85.

EFEITO IMUNOMODULATÓRIO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO EM LINFÓCITOS T

Nunes FB, Graziottin CM, Alves-Filho JC, Lunardelli A, Caberlon E, Peres A, De Oliveira JR.

RESUMO

A sepse é a causa mais comum de mortalidade nas UTIs. A Frutose-1,6-bisfosfato (FBP), um açúcar com dois fosfatos pertencente à via intermediária da glicólise, apresenta resultados positivos para o uso terapêutico na sepse. O objetivo deste estudo foi verificar se a FBP teria algum efeito sobre o sistema imune, especialmente com relação à proliferação de linfócitos. As células mononucleares de sangue periférico foram isoladas do sangue de pessoas saudáveis por gradiente de centrifugação. Os linfócitos T foram estimulados com fitohemaglutinina (PHA) por 96h em concentrações variadas de FBP. A FBP nas concentrações entre 1,2 mM e 10 mM diminuíram a proliferação, mas em 5,0 e 10 mM reduziram a viabilidade celular. Os níveis de sIL-2R foram reduzidos nas concentrações entre 1,2 mM e 10 mM. Este estudo demonstra que a FBP possui um importante efeito na proliferação de linfócitos T. Em conclusão, os resultados sugerem um efeito imunomodulatório da FBP e estes podem estar correlacionados com o efeito protetor frente ao choque séptico.

Palavras chaves: Imunomodulação, Frutose-1,6-bisfosfato, Interleucina-2, Sepse.

1. Introdução

A sepse é uma resposta inflamatória sistêmica à infecção (1). Pode levar a uma reação inflamatória generalizada dos órgãos onde, muitas vezes, o tratamento acaba sendo um fracasso, acarretando em uma disfunção de múltiplos órgãos (2). A sepse continua sendo um importante problema nas UTIs, sendo a causa mais comum de mortalidade (3).

A Frutose-1,6-bisfosfato (FBP), um açúcar com dois fosfatos pertencente à via intermediária da glicólise, apresentando resultados positivos para o uso terapêutico na sepse. Dois tipos básicos de mecanismos de ação foram propostos para a FBP. O primeiro é que a FBP é metabolizada por células, produzindo diretamente trifosfato de adenosina (ATP) ou modulando o metabolismo e aumentando a produção do mesmo. Esta preservação de ATP foi demonstrada em numerosos estudos (4,5,6,7,8). Uma segunda proposta é que a FBP tenha ação fora da célula ou na membrana da mesma, isto justifica-se pelo fato de que a droga possui uma carga molecular elevada devido aos seus fosfatos, sendo, portanto, provável que ela tenha dificuldade em atravessar a membrana celular. A FBP forma com o Ca^{2+} um quelato que é proporcional à concentração do açúcar, diminuindo o Ca^{2+} ionizado. De fato, foi relatado que o Ca^{2+} estava reduzido no tecido do miocárdio na presença de FBP (9,6). Estudos recentes demonstraram que a FBP apresenta proteção contra os danos causados pela ciclosporina-A, anfotericina B, e fenciclidina que induzem toxicidade no miocárdio. Parece que a FBP exerce efeito protetor ao inibir a bomba (Ca^{2+} -ATPase) e a atividade da Oxido Nítrico Sintase (NOS), diminuindo a síntese de óxido nítrico (10,11). Planas *et al* mostraram que a ação inflamatória da carragenina pode ser atenuada por administração deste açúcar (12). A relação entre o efeito protetor da FBP contra o dano celular e as modificações produzidas nos fluxos metabólicos e na permeabilidade da membrana ao potássio foi estudada em hepatócitos isolados de ratos. A

incubação destas células na presença de FBP reduziu a atividade metabólica, sem afetar os níveis de ATP, sugerindo um “downregulation” na renovação de ATP. Na presença de FBP com hepatócitos, o fluxo de K^+ , tanto passivo como ativo, diminuiu. Entretanto, a atividade da bomba Na^+-K^+ de membranas semipurificadas não se alterou sobre o efeito da FBP, o que sugere ser um efeito secundário à alteração da bomba de Na^+-K^+ , e não um efeito direto. Além disso, células tratadas com galactosamina mostraram um aumento marcante na permeabilidade do K^+ , e isso foi abolido na presença de FBP. Este efeito protetor pode ser devido à diminuição do transporte de K^+ (13, 14).

As evidências sugerem que uma reação inflamatória massiva é o resultado da liberação de citocinas do sistema imunológico, e isto leva ao quadro clínico da sepse (15). O fator de necrose tumoral (FNT- α) e a interleucina-1 (IL-1) são as duas primeiras citocinas envolvidas nesta patologia (16). O Interferon- γ pode agir juntamente com a interleucina-2 (IL-2) promovendo o aumento da liberação de FNT- α , fazendo com que ocorra a ativação de linfócitos-B, aumentando, assim, a produção de anticorpos (17). Muitas toxinas bacterianas causam a liberação de IL-2 pelos linfócitos.

A IL-2, concomitantemente com a infusão de células linfocitárias NK ativadas, tem sido usada como tratamento para o câncer, mas em relação ao choque séptico obteve-se resultados pouco alentadores. Em pacientes tratados com IL-2, 65% desenvolveram hipotensão associada com o aumento da permeabilidade vascular, alguns dos quais foram a óbito. Os sobrenadantes de linfócitos estimulados com IL-2 foram administrados em ratos e verificou-se que a função cardíaca foi reduzida em mais de 50%. Assim, provavelmente algum fator secretado por linfócitos estimulados pela IL-2, ou ela mesma, são cardiotoxícos. Verificou-se que pacientes tratados com IL-2 apresentaram um aumento do FNT- α (18). A

ativação de linfócitos T induz a síntese de IL-2, bem como a expressão de receptores específicos de superfície para a própria citocina (19). A produção, secreção e expressão de receptores de IL-2 são primordiais para o crescimento e estimulação de linfócitos T.

O íon Ca^{2+} tem sido sugerido como um importante mensageiro por transmitir os sinais entre a membrana plasmática e os compartimentos internos da célula. O mecanismo pelo qual o Ca^{2+} citoplasmático ativa linfócitos T sugere que o mesmo seja dependente do Ca^{2+} extracelular (19). Uma variedade de canais de Ca^{2+} foi identificada em tipos diferentes de células. Alguns mostraram ser potencialmente dependentes (20,21). A mudança no potencial elétrico transmembrana também foi correlacionada com a divisão e o crescimento celular. A Fitohemaglutinina (PHA) induz o aumento do $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular e pode ser acompanhado por hiperpolarização no potencial de membrana (22), possivelmente devido aos efeitos do Ca^{2+} e do K^+ . As mudanças nos potenciais elétricos transmembrana são importantes para que ocorra a proliferação de linfócitos T (19).

Baseado em estudos citados até aqui, verificamos se a FBP teria algum efeito no sistema imune, especialmente com relação à proliferação de linfócitos T.

2. Materiais e Métodos

2.1 Reagentes

RPMI 1640, solução de Hanks, penicilina G (5.000 U/ml), streptomina (5.000mg/ml), soro humano AB foram adquiridos da Life Technologies (Grand Island, NY). O Lymphoprep foi obtido da Nycomed Pharma (Oslo, Norway). A Frutose-1,6-bifosfato, fitohemaglutinina (PHA) e o MTT (3-[4-5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium de bromide) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO).

2.2 Preparação das células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)

As PBMCs foram isoladas do sangue de pessoas saudáveis por gradiente de centrifugação. Um total de 20 ml do sangue heparinizado, separado do plasma, foi diluído 1:2 com Hanks. Foi sobreposto para cada 7 ml da mistura 3 ml de Lymphoprep e centrifugado em 400 X g. em temperatura ambiente por 30 minutos. As PBMCs, incluindo linfócitos T, foram colhidas com uma pipeta estéril, transferidas e lavadas duas vezes no Hanks. As células foram então ressuspendidas em RPMI 1640 com 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de streptomicina e 5% soro humano AB, obtendo-se uma concentração celular de $1,6 \times 10^5$ /ml. A viabilidade celular por exclusão do trypan blue era uniformemente maior ou igual a 98%.

2.3 Teste de Linfoproliferação

A fitohemaglutinina foi usada como mitógeno para proliferação de linfócitos T. A Frutose-1,6-bisfosfato foi dissolvida em RPMI 1640. As células mononucleares do sangue ($1,6 \times 10^5$ células/ml) foram plaqueadas diretamente com concentrações de 0,3; 0,6; 1,2; 2,5; 5,0 e 10mM de FBP, que foram cultivadas na presença do mitógeno (10 µg/ml, PHA) e colocadas em placas de 96 poços (Corning Inc., Corning, NY) em uma estufa a 37°C com 5% de CO₂ úmido por um período de 96 h.

A proliferação dos linfócitos foi determinada pelo ensaio de MTT (23). O MTT foi dissolvido em RPMI 1640 5mg/ml e adicionado nos poços que foram incubados a 37 °C por 4 h. Foi adicionado isopropanol para dissolver os cristais azuis escuros que eram formados. Depois de alguns minutos, os poços foram passados por um leitor Hyperion Micro-Leitor, em

comprimento de onda de 570 nm. Os resultados são apresentados com a medida da densidade óptica e todas reações foram executadas em quadruplicata.

2.4 Ensaio de Citotoxicidade

A Frutose-1,6-bisfosfato foi dissolvida em RPMI 1640 e adicionada diretamente a PBMCs ($1,6 \times 10^5$ células/ml), que foram incubadas em placas de 24 poços (Corning Inc., Corning, NY) a 37°C com 5% de CO₂ úmido em um período de 24 horas. A viabilidade celular foi verificada pelo método de exclusão do trypan blue. Todos os testes foram executados em quadruplicata.

2.5 Ensaio para receptores solúveis de IL-2 (sIL-2R)

Níveis de receptores solúveis de IL-2 foram medidos por ELISA, com uso de R&D Systems Kit (Minneapolis, MN) de acordo com as instruções do fabricante. Os sobrenadantes das culturas foram coletados depois de 96 horas do ensaio de linfoproliferação. Todos os padrões e amostras foram testados em duplicata. A concentração sIL-2R foi expressa em pg/ml.

2.6 Análise Estatística

As diferenças estatísticas dos grupos, foram testadas pela análise de variância (ANOVA) usando SPSS 9.0 do Windows (8.0).

Todos os resultados expressos com significância \pm DP, $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados

3.1 Efeito imunomodulador da Frutose-1,6-bisfosfato em Linfócitos T estimulados com PHA

Primeiramente foi avaliado o efeito imunomodulatório da Frutose-1,6-bisfosfato sobre a proliferação de Linfócitos T *in vitro* na presença de PHA (10 µg/ml).

O resultado apresentado na figura 1 demonstra que a FBP em concentrações entre 1,2 mM e 10 mM diminui significativamente a proliferação destas células.

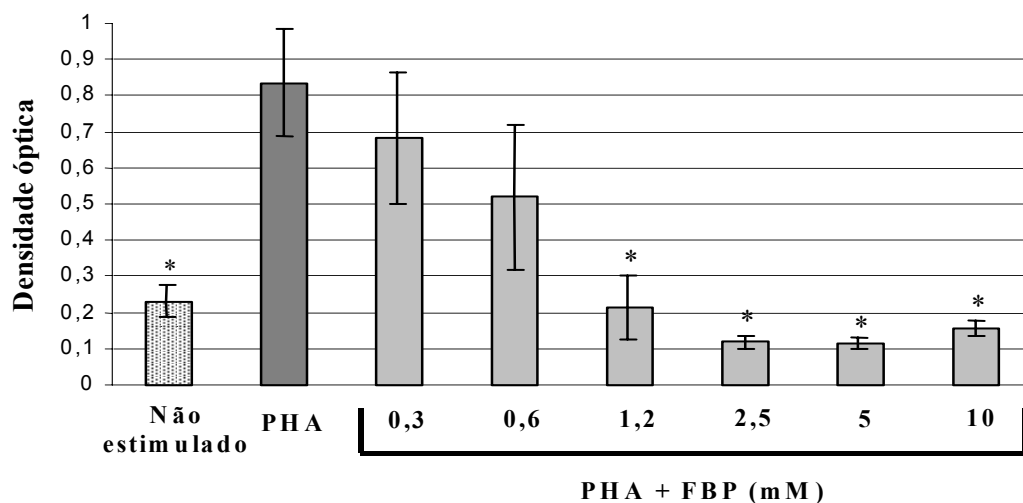


Figura 1: O efeito Imunomodulatório da Frutose-1,6-bisfosfato em linfócitos T estimulados com PHA. Os PBMCs foram estimulados por 96 h com PHA, juntamente com diferentes concentrações de FBP. A proliferação foi medida usando o ensaio colorimétrico de MTT. Os resultados são apresentados com uma densidade óptica de significância \pm DP e todas reações foram executadas em quadruplicata. O asterisco demonstra uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle PHA (estimulado).

3.2.Citotoxicidade da Frutose-1,6-bifosfato em PBMCs

Para determinar se o efeito inibitório da Frutose-1,6-bisfosfato na linfoproliferação era devido à morte celular, a viabilidade celular de PBMCs incubadas com FBP foi investigada.

Como mostra a figura 2, a FBP reduziu significativamente a viabilidade celular somente nas concentrações de 5,0 e 10 mM.

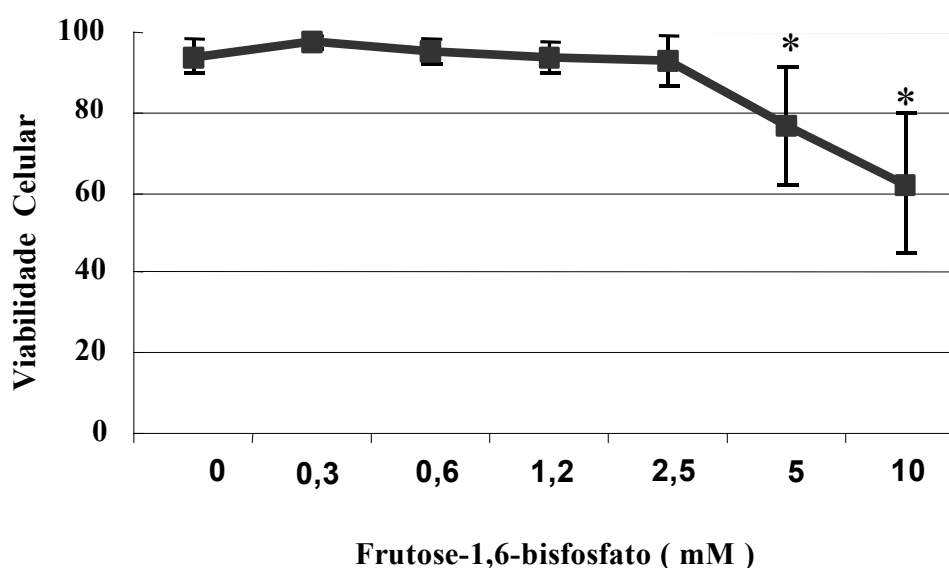


Figura 2: Citotoxicidade da Frutose-1,6-bisfosfato em PBMCs. Os PBMCs foram incubados por 24h com várias concentrações de FBP. A viabilidade celular foi verificada pelo método de exclusão do trypan blue. Todos os testes foram executados em quadruplicata. Os resultados são apresentados em porcentagem com significância \pm DP e todas reações foram executadas em quadruplicata. O asterisco demonstra uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

3.3. Níveis de receptores solúveis de IL-2 na presença de Frutose-1,6-bisfosfato

Para confirmar a eficácia do efeito inibitório da Frutose-1,6-bisfosfato na linfoproliferação, foram mensurados os níveis de sIL-2R nos sobrenadantes das culturas.

Como mostra a figura 3, a FBP reduziu significativamente os níveis de sIL-2R nas concentrações entre 1,2 mM e 10 mM.

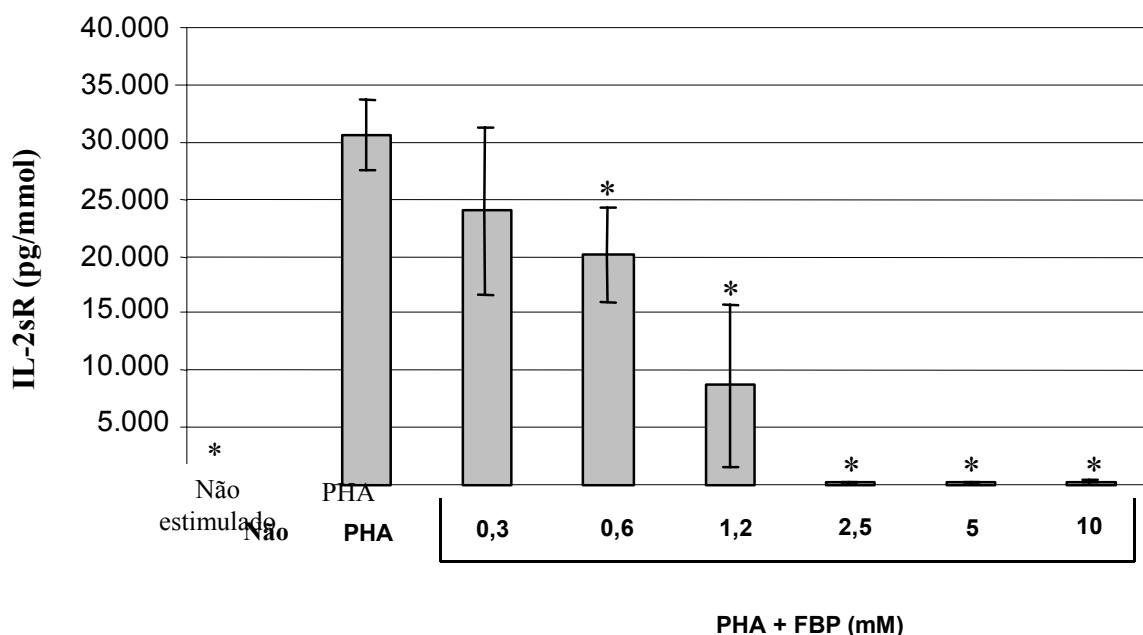


Figura 3: Os níveis de receptores solúveis de IL-2 na presença de Frutose-1,6-bisfosfato. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 96h após o ensaio de limfoproliferação. Os receptores solúveis de IL-2 foram medidos pelo método de Enzima Imuno Ensaio (ELISA). Os resultados foram expressos com uma significância \pm DP .O asterisco demonstra uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle PHA (estimulado).

4. Discussão

O objetivo deste trabalho foi investigar o possível efeito da FBP sobre a proliferação de Linfócitos T, relacionando-o com as alterações imunológicas que levam ao quadro da sepse. Este estudo sugere que a FBP tem um importante efeito imunomodulatório. O aumento das

concentrações de FBP foi associado a uma redução proporcional da proliferação de Linfócitos T.

Para investigar se o efeito inibitório da Frutose-1,6-bisfosfato frente a limfoproliferação foi devido à morte celular, ou seja, devido a sua toxicidade, foram realizados ensaios para verificar a viabilidade celular em PBMCs incubadas com FBP. Como demonstrado na Fig 2, a FBP reduziu significativamente a viabilidade celular apenas nas concentrações de 5,0 e 10 mM.

Foi também investigado o mecanismo responsável pelo efeito inibitório em linfócitos T, pela dosagem de sIL-2R. A Interleucina-2 (IL-2) é uma linfocina sintetizada e secretada por linfócitos T ativados por lecitinas ou antígenos, reagindo com receptores específicos de alta-afinidade na superfície desses linfócitos. Em contraste com outros sistemas mediados por hormônios, a ativação celular é um pré-requisito para a indução de ambos, ligantes (IL-2) e seus receptores (IL-2R), o último terá que se expressar rapidamente na superfície da célula em tempo-dependente e maneira heterogênea. O IL-2R solúvel pode servir como uma rota imunoregulatória para o crescimento da célula e sua diferenciação (24).

Embora houvesse mudanças na viabilidade celular, a Frutose-1,6-bisfosfato mostrou um efeito inibitório na proliferação dos Linfócitos T e na expressão de sIL-2R. Tem sido reportado que a IL-2 atua em Th1 e é uma citocina expressa por Linfócitos T ativados, facilitando a proliferação dos mesmos e auxiliando a regulação de ações de uma variedade de outros tipos de células de defesa (25). A IL-2 é uma das principais citocinas envolvidas na cascata de resposta a agentes estranhos e a sua inibição pela FBP pode acarretar mudanças significativas no sistema imune. A concentração de receptores solúveis de IL-2 foi reduzida nas doses de 1,2; 2,5; 5,0 e 10 mM de FBP, mas somente 1,2 e 2,5 mM foram concentrações eficientes para a

inibição da proliferação e da expressão da citocina, sendo as concentrações de 5,0 e 10 mM apresentaram citotóxicas.

A FBP forma com o Ca^{2+} um quelato que é proporcional à concentração do açúcar, diminuindo o Ca^{2+} ionizado. De fato, foi relatado que Ca^{2+} estava reduzido no tecido de miocárdio na presença de FBP (9,6). Acredita-se que o mecanismo pelo qual FBP diminui a liberação de IL-2 inclui um “downregulation” do influxo de Ca^{+2} , mas a natureza específica do efeito não está bem estabelecida.

Outra possível explicação pode ser que a FBP age na membrana das células, modificando a permeabilidade de alguns íons. O uso de FBP em hepatócitos provocou uma diminuição dos fluxos passivos e ativos, do íon K^+ (13). A condutibilidade do K^+ pela membrana é o maior determinante da geração do potencial transmembrana dos Linfócitos T. A mudança no potencial elétrico transmembrana sugere haver acontecimentos prévios e importantes na mitogênese dos linfócitos (26), o bloqueio dos canais de K^+ inibe a produção de IL-2 e a proliferação de linfócitos T induzida por lecitina (27).

Em conclusão, nossos resultados informados aqui sugerem um efeito imunomodulatório da FBP na proliferação de Linfócitos T e estes resultados podem estar correlacionados com o efeito protetor frente ao choque séptico.

5. Referências Bibliográficas

- 1- Matot I, Sprung CL. Definition of Sepsis. Intensive Care Medicine 2001;27:S3-S9.
- 2- Bone RB, Grodzin CG, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. Chest 1998;112:235-243.

- 3- Parrillo JE, Parker MM, Natanson C. Septic Shock; advances in understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990; 113:227-242.
- 4- 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;67:1463-1468.
- 5- Bickler PE, Kelleher JA. Fructose-1,6-bisphosphate stabilizes brain intracellular calcium during hypoxia in rats. *Stroke* 1999;223:1617-1622.
- 6- Galzigna L, Rizzoli V, Bianchi M, Rigobello MP, Scuri R. Some effects of fructose-1,6-bisphosphate on rat myocardial tissue related to a membrane-stabilizing action. *Cell Biochem Funct* 1989;7:91-96.
- 7- Kirtley ME, McKay M. Fructose-1,6-diphosphate: a regulator of metabolism. *Mol Cell Biochem* 1977;18:141.
- 8- Mazer CD, Demas KA, Cason BA, Simpson P, Hickey RF. Uptake and metabolism of fructose-1,6-diphosphate by cell cultures of rat myocardium. *Anesthesiology* 1986;65:A254.
- 9- Fasolato C, Deana R, Rigoni F, Galzigna L. Fructose-1,6-diphosphate improves the mortality and other functions of bovine spermatozoa. *Med Sci Res* 1987;15:203-204.
- 10- Hutcheson A, Rao M, Olinde K, Markov A. Myocardial toxicity of Cyclosporin A: Inhibition of calcium ATPase and nitric oxide synthase activities and attenuation by fructose-1,6-diphosphate *in vitro*. *Res Comm Mol Path Pharm* 1995;89:17-26.
- 11- Rajeswara Rao M, Hutcheson A, Markov A. Reversal of phencyclidine inhibited rat myocardial SR membrane Ca²⁺ ATPase activity by fructose-1,6-diphosphate. *Res Commun Alcohol Subs Abuse* 1996;17:49-56.

- 12- Planas ME, Sàhnchez S, González P, Oliveira JR et al. Protective effect of fructose-1,6-bisphosphate against carrageenan-induced inflammation. *Eur J Pharm* 1993;237:251-255.
- 13- Roig T, Bartrons R, Bermúdez J. Exogenous fructose-1,6-bisphosphate reduces K^+ permeability in isolated rat hepatocytes. *American Physiological Society* 1997;C473-C478.
- 14- Cohly HHP, Stephens JW, Angel MF, Johnson JC, Markov AK. The role of Fructose-1,6-diphosphate in cell migration and proliferation in an *in vitro* xenograft blood vessel model of vascular wound healing. *In Vitro Cell Dev Biol – Animal* 1999;35:510-514.
- 15- Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunkel SL. Balance of Inflammatory Cytokines Related to Severity and Mortality of Murine Sepsis. *Infection and Immunity* 1996;4733-4738.
- 16- Dinarello CA. Proinflammatory and Anti-inflammatory Cytokines as Mediators in the Pathogenesis of Septic Shock *Chest* 1997;112(6):321S-329S.
- 17- Dinarello CA. The Proinflammatory Cytokines Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor and Treatment of the Septic Shock Syndrome. *The Journal of Infectious Diseases* 1991;163:1177-1184.
- 18- Dal Nogare AR. Southwestern Internal Medicine Conference: Septic Shock. *The American Journal of the Medical Sciences* 1991;302(1):50-65.
- 19- Gelfand EW, Mills GB, Cheung RK, Lee JWW, Grinstein S. Transmembrane Ion Fluxes during Activation of Human T lymphocytes: Role of Ca^{2+} , Na^+/H^+ Exchange and Phospholipid Turnover. *Immunological Reviews* 1987;95:59-87.
- 20- Nilius B, Hess P, Lansman JB, Tsien RY. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 1985;316:443.

- 21- Nowycky MC, Fox AP, Tsien RY. Three types of neuronal calcium channels with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 1985;316:440.
- 22- Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ. T-cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free Ca^{2+} and membrane potential in lymphocytes. *Nature* 1982;295:68.
- 23- Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 1983;65:55-63.
- 24- Rubin LA, Nelson DL. The Soluble Interleukin-2 Receptor: Biology, Function and Clinical Application. *American College of Physicians* 1990;113:619-627.
- 25- Smith KA. Interleukin-2: inception, impact and implications. *Science* 1988;240:1169-1176.
- 26- Grinstein S, Clarke CA, DuPre A, Rothstein A. Volume-induced increase of anion permeability in human lymphocytes. *J Gen Physiol* 1982;80:801.
- 27- Chandy KG, DeCoursey TE, Cahalan MD, McLaughlin C, Gupta S. Voltage gated potassium channel required for human T lymphocyte activation. *J Exp Med* 1984;160:369.
- 28- Matot I, Sprung CL. Definition of Sepsis. *Intensive Care Medicine* 2001;27:S3-S9.
- 29- Bone RB, Grodzin CG, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1998;112:235-243.
- 30- Parrillo JE, Parker MM, Natanson C. Septic Shock; advances in understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990;113:227-242.
- 31- 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;67:1463-1468.
- 32- Bickler PE, Kelleher JA. Fructose-1,6-bisphosphate stabilizes brain intracellular calcium during hypoxia in rats. *Stroke* 1992;23:1617-1622.

- 33- Galzigna L, Rizzoli V, Bianchi M, Rigobello MP, Scuri R. Some effects of fructose-1,6-bisphosphate on rat myocardial tissue related to a membrane-stabilizing action. *Cell Biochem Funct* 1989;7:91-96.
- 34- Kirtley ME, McKay M. Fructose-1,6-diphosphate: a regulator of metabolism. *Mol Cell Biochem* 1977;18:141.
- 35- Mazer CD, Demas KA, Cason BA, Simpson P, Hickey RF. Uptake and metabolism of fructose-1,6-diphosphate by cell cultures of rat myocardium. *Anesthesiology* 1986;65:A254.
- 36- Fasolato C, Deana R, Rigoni F, Galzigna L. Fructose-1,6-diphosphate improves the mortality and other functions of bovine spermatozoa. *Med Sci Res* 1987;15:203-204.
- 37- Hutcheson A, Rao M, Olinde K, Markov A. Myocardial toxicity of Cyclosporin A: Inhibition of calcium ATPase and nitric oxide synthase activities and attenuation by fructose-1,6-diphosphate *in vitro*. *Res Comm Mol Path Pharm* 1995;89:17-26.
- 38- Rajeswara Rao M, Hutcheson A, Markov A. Reversal of phencyclidine inhibited rat myocardial SR membrane Ca²⁺ ATPase activity by fructose-1,6-diphosphate. *Res Commun Alcohol Subs Abuse* 1996;17:49-56.
- 39- Planas ME, Sànhz S, González P, Oliveira JR et al. Protective effect of fructose-1,6-bisphosphate against carrageenan-induced inflammation. *Eur J Pharm* 1993;237:251-255.
- 40- Roig T, Bartrons R, Bermúdez J. Exogenous fructose-1,6-bisphosphate reduces K⁺ permeability in isolated rat hepatocytes. *American Physiological Society* 1997;C473-C478.
- 41- Cohly HHP, Stephens JW, Angel MF, Johnson JC, Markov AK. The role of Fructose-1,6-diphosphate in cell migration and proliferation in an *in vitro* xenograft blood vessel model of vascular wound healing. *In Vitro Cell Dev Biol – Animal* 1999;35:510-514.

- 42- Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunkel SL. Balance of Inflammatory Cytokines Related to Severity and Mortality of Murine Sepsis. *Infection and Immunity* 1996;4733-4738.
- 43- Dinarello CA. Proinflammatory and Anti-inflammatory Cytokines as Mediators in the Pathogenesis of Septic Shock *Chest* 1997;112(6):321S-329S.
- 44- Dinarello CA. The Proinflammatory Cytokines Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor and Treatment of the Septic Shock Syndrome. *The Journal of Infectious Diseases* 1991;163:1177-1184.
- 45- Dal Nogare AR. Southwestern Internal Medicine Conference: Septic Shock. *The American Journal of the Medical Sciences* 1991;302(1):50-65.
- 46- Gelfand EW, Mills GB, Cheung RK, Lee JWW, Grinstein S. Transmembrane Ion Fluxes during Activation of Human T lymphocytes: Role of Ca^{2+} , Na^+/H^+ Exchange and Phospholipid Turnover. *Immunological Reviews* 1987;95:59-87.
- 47- Nilius B, Hess P, Lansman JB, Tsien RY. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 1985;316:443.
- 48- Nowycky MC, Fox AP, Tsien RY. Three types of neuronal calcium channels with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 1985;316:440.
- 49- Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ. T-cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free Ca^{2+} and membrane potential in lymphocytes. *Nature* 1982;295:68.
- 50- Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 1983;65:55-63.
- 51- Rubin LA, Nelson DL. The Soluble Interleukin-2 Receptor: Biology, Function and Clinical Application. *American College of Physicians* 1990;113:619-627.

- 52- Smith KA. Interleukin-2: inception, impact and implications. *Science* 1988;240:1169-1176.
- 53- Grinstein S, Clarke CA, DuPre A, Rothstein A. Volume-induced increase of anion permeability in human lymphocytes. *J Gen Physiol* 1982;80:801.
- 54- Chandy KG, DeCoursey TE, Cahalan MD, McLaughlin C, Gupta S. Voltage gated potassium channel required for human T lymphocyte activation. *J Exp Med* 1984;160:369.

Artigo 3

Nunes FB, Alves-Filho JCF, Bastos CMA, Tessele PM, Caberlon E, Moreira KB, Ferreira TM and Oliveira JR. Effect of the Chlorpropamide and Fructose-1,6-bisphosphate on Soluble TNF receptor II levels.

Enviado em 15 de maio de 2003 para Immunology.

Effect of the Chlorpropamide and Fructose-1,6-bisphosphate on Soluble TNF receptor II levels

Fernanda B. Nunes, José Carlos F. Alves-Filho, Carolina M. Alves Bastos, Paola M. Tessele, Eduardo Caberlon, Karla B. Moreira, Taísa M. Ferreira and Jarbas R. de Oliveira. Laboratório de Pesquisa em Biofísica, Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

*Corresponding author:

Dr. Jarbas R. de Oliveira

Laboratório de Pesquisa em Biofísica

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Av. Ipiranga,6681 - Prédio 12C - Sala 263 - C.P.1429

Porto Alegre - RS - Brazil

Phone: + 55 51 3320 3500, extension line: 4147

FAX: + 55 51 3320-3612

E-mail: jarbas@puers.br

SUMMARY

Septic shock represents an extreme example of the normal inflammatory response run amuck. Inflammatory cytokines are central to the pathogenesis of septic shock, and future therapies will depend on interfering with the effects of these cytokines. The aim of this study was investigated the effect of the two drugs, Fructose-1,6-bisphosphate (FBP), a high-energy glycolytic pathway intermediate, and chlorpropamide (sulfonylurea) in proliferation of T-lymphocytes and levels of soluble receptors of TNF (sTNFR_{II}). Peripheral blood mononuclear cells (PMBCs) were isolated from the blood of healthy humans by gradient centrifugation. T-lymphocytes were stimulated for 96 h with phytohemagglutinin (PHA) and varying concentrations of chlorpropamide and FBP; and 24 h with lipopolissacaride (LPS) and varying concentrations of chlorpropamide and FBP were used. Chlorpropamide at concentrations between 2.5 and 10mM and FBP at concentrations between 1.25 and 10mM decreased proliferation of T-lymphocytes. The Chlorpropamide reduced the viability only at concentration 10mM and FBP at concentrations 5.0 and 10mM. The levels of sTNFR_{II} were reduced at Chlorpropamide concentrations between 5mM and 2.5 mM and FBP between 1.25 and 2.5 mM. In conclusion, the results suggest that so much to Chlorpropamide as regards FBP they inhibit the cellular proliferation and the levels of sTNFR_{II} and that can be related with the blockade of the channels of potassium, of that form acting as powerful agents on immunomodulation.

INTRODUCTION

Septic shock represents an extreme example of the normal inflammatory response run amuck. The systemic effects of sepsis are mostly caused by host's endogenous cytokines, which are usually beneficial when limited to discrete tissue infection sites. However, they are often lethal when they enter the circulation. The major targets of circulating cytokines are leukocytes, endothelial cells, and the heart. Inflammatory cytokines are central to the pathogenesis of septic shock, and future therapies will depend on interfering with the effects of these cytokines. LPS is a major factor when gram negative bacterial infections are complicated by shock. Most of the hemodynamic effects of LPS are now considered to be secondary to LPS induced synthesis and release of TNF from macrophages. TNFs play a necessary and beneficial role as mediators of host resistance to infections and tumor formation. However, over-production or inappropriate expression of these factors can lead to a variety of pathological conditions, including wasting, systemic toxicity, and septic shock.^{1,2}

The actions of TNFs are produced subsequent to binding of the factors to cell surface receptors. Two distinct TNF receptors have been identified and cloned. Virtually all cell types studied shown the presence of one or both of these receptor types (TNFRII- 75 kDa and TNFI- 55 kDa).² The two receptor types are immunologically distinct but their extracellular domains shown similarities in the pattern of cysteine residue locations in four domains.³ The intracellular domains of the two receptor types are apparently unrelated, suggesting the possibility that the two receptor types employ different signal transduction pathways. Several groups have identified soluble TNF binding proteins in human serum and urine⁴ that can neutralize the biological activities of TNF alpha and TNF beta. The mechanisms involved in

the induction of shedding of the TNF receptors are not well understood. There are reports of correlation between increased TNF levels and soluble receptors levels, suggesting generally that stimuli that cause TNF levels to rise also induce shedding of TNF receptors.^{5,6} It has been reported that at low concentrations of TNF, binding to soluble receptors can stabilize TNF and augment some of its activities.⁷ Thus it is possible that under some conditions the pool of TNF bound to soluble receptors could represent a reservoir for the stabilization and controlled release of TNF.

Fructose-1,6-bisphosphate (FBP) is a naturally occurring high-energy glycolytic pathway intermediate and it is believed to have a protective effect on cells injured by chemical.⁸ In recent work were demonstrated that the FBP at concentrations between 1.2 and 10 mM decreased levels of soluble IL-2 receptor.⁹ In conclusion, the study demonstrated that FBP has important effect on immunomodulatory. The possible explanation could be that the FBP interacted with cell membranes, modifying the ion permeability. In the presence of FBP, passive and active K^+ effluxes in hepatocytes decreased.¹⁰ The conductance of the membrane to K^+ is a major determinant of T-lymphocyte transmembrane potential. Changes in transmembrane electrical potential are suggested to be important early events in lymphocyte mitogenesis.¹¹ Sulfonylureas such as chlorpropamide is administered to patients with type-2 diabetes mellitus (non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM), which show their pharmacological effect by induction of insulin secretion from pancreatic β -cells. Their principal target is the ATP-sensitive potassium channel, which plays a key role in insulin secretion.¹² We suggest that these two drugs (FBP and Chlorpropamide) can act in the same way, for the propriety of both when blocking ATP-sensitive potassium channel. In vitro and in vivo studies indicate that blockage of potassium channels inhibits T-lymphocytes activation,

suggesting that potassium channels may be a target for immunomodulation. The aim of this study was to research alternative drugs, FBP and chlorpropamide in proliferation of T-lymphocytes and levels of sTNFRII involved in the septic shock.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

The PBMCs were isolated from the blood of healthy humans by gradient centrifugation on Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norway) and resuspended in RPMI 1640 supplemented with 1% penicillin-streptomycin and 5% human AB serum (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md) at final cell density of 1.6×10^6 /ml as previously described.⁹ Platelet contamination of these preparations was < 1%; viability by trypan blue dye exclusion was uniformly greater than or equal to 98%.

Lymphoproliferation assay

Phytohemagglutinin (PHA) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) was used for T-lymphocyte proliferation. Chlorpropamide and FBP was dissolved in RPMI 1640. Peripheral blood mononuclear cells (1.6×10^5 cell/well) were plated directly with different concentrations of chlorpropamide (0.6 mM to 10 mM) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) and FBP (0.6 mM to 10 mM) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), which were cultured in the presence of mitogen (10 μ g/ml, PHA) in 96-well microtiter plates (Corning Inc., Corning, NY) at 37°C in a 5% CO₂-humidified incubator for 96 h.

Lymphocyte proliferation was determined by MTT assay as previously described.¹³ Briefly, MTT (3-[4-5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) was dissolved in RPMI 1640 at 5mg/ml and added to all wells of an assay, and plates were incubated at 37 °C for 4 h. Isopropanol was added to all wells and

mixed thoroughly to dissolve the dark blue crystals. After a few minutes, the plates were read on a Hyperion MicroReader reader, using a test wavelength of 570 nm, a reference wavelength of 630 nm.

Cytotoxicity assay

Chlorpropamide and Fructose-1.6-bisphosphate was dissolved in RPMI 1640 and added directly to PBMCs (1.6×10^5 cell/well), which were incubated in 24-well microtiter plates (Corning Inc., Corning, NY) at 37°C in a 5% CO₂-humidified incubator. The cellular viability was performed by MTT assay as previously described¹³ after 96 h of the incubation. The results are presented as percentage by mean \pm SD and all reactions were performed in quadruplicate.

Assay for Soluble TNF receptor (sTNFR_{II}) levels

sTNFR_{II} production was assessed by measuring sTNFR_{II} levels in supernatants from PBMCs incubated at a final concentration of 1.6×10^5 cell/well in complete culture medium for 24 hours at 37°C in 5% CO₂ atmosphere.¹⁴ Cells were cultured in 24-well plates and the conditions consisted of (i) unstimulated; (ii) stimulated with endotoxin (LPS) (*Escherichia coli*, Sigma, 0.1 µg/ml final concentration) to measure soluble TNF receptor (sTNFR_{II}, 24 h); (iii) stimulated (LPS) plus Fructose-1.6-bisphosphate 2.5mM and 1.25mM; (iv) stimulated (LPS) plus chlorpropamide 5mM and 2.5mM. This concentrations was chosen as it has been shown to consistently suppress immunological function in vitro. After incubation, well contents were transferred to eppendorfs, centrifuged at 900 g for 15 min, supernatants removed and stored at -70°C until analyses. Commercially available ELISA kits (R&D,UK) were used to measure human soluble TNF receptor concentrations in cell culture supernatant. The λ 450 was detected

using an ELISA plate reader (Biorad, UK). All standards and samples were tested in quadruplicate. The sTNFRII concentrations were expressed in pg/ml.

Statistical analysis

Group differences were tested by one-way analysis of variance (ANOVA) using SPSS 9.0 for Windows (8.0). The results are expressed as means \pm SEM and all reactions were performed in quadruplicate. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Immunomodulatory effect of chlorpropamide and FBP on T-lymphocytes stimulated with PHA

We first evaluated the immunomodulatory effect of chlorpropamide and FBP on proliferation of T-lymphocytes in vitro in the presence of PHA (10 $\mu\text{g/ml}$). Results presented in Figure 1 show that chlorpropamide at concentrations between 2.5 mM and 10 mM significantly decreased proliferation of these cells ($P < 0.05$) and FBP at concentrations between 1.25 mM and 10 mM significantly decreased proliferation of these cells ($P < 0.05$).

Cytotoxicity effect of chlorpropamide and FBP on PBMCs

To determine whether the inhibitory effect of Chlorpropamide and Fructose-1.6-bisphosphate on lymphoproliferation was due to cellular death, the cellular viability of Chlorpropamide and FBP in PBMCs was investigated. As shown in Figure 2, Chlorpropamide significantly ($P < 0.05$) reduced the cell viability only at concentration 10 mM and Fructose-1.6-bisphosphate significantly ($P < 0.05$) reduced the cell viability at concentration 5 mM and 10 mM.

Levels of sTNFRII stimulated with LPS

It was determined whether differences in sTNFRII production could be observed between experimental groups. As presented in Figure 3, FBP significantly reduced the levels of sTNFRII at concentrations the 2.5mM and 1.25mM, and Chlorpropamide reduced the levels of sTNFRII at concentration of 5mM and 2.5 mM ($P < 0,05$).

DISCUSSION

The objective of this work was to investigate the potential effect of FBP and Chlorpropamide on T-lymphocytes proliferation and levels of sTNF-RII. Increase concentrations of FBP and Chlorpropamide were associated with a proportional reduction of T-lymphocytes proliferation.

Regulation of the Ca^{++} - signaling pathways in T-lymphocytes is a mechanism that has been exploited to modulate immune responses.¹⁵ In vitro T-lymphocytes functions can be suppressed by interfering directly with the increases in intracellular calcium that follow activation of the TCR (T-cell receptor). In human T-lymphocytes, these changes in calcium level require, at least in part, the function of the potassium channel.

Blockers of potassium channel, such as margatoxin and charybdotoxin depolarize T-lymphocytes,¹⁶ and inhibit in vitro induced increases in intracellular calcium, cytokine production, and T-lymphocytes proliferation.^{17,18} Koo and cols.¹⁹ also showed that blockade of the potassium channel inhibits immune responses in vitro.

Although the focus of anticytokine strategies in treating septic shock is specific for each cytokine, reducing the synthesis of either IL-1 or TNF, albeit nonspecific, reduces the biologic responses to bacterial challenge or inflammation.²⁰ There are three points in the sequence of the pathogenesis of septic shock at which therapy can be instituted effectively. First, the nidus

of infection can be eradicated with appropriate antimicrobial therapy, surgical drainage, or both. Second, the sepsis-associated cardiovascular, metabolic, and multiorgan system disturbances can be treated in an intensive care unit. Third, inhibitors of toxic mediators are being developed. Treatments that inhibit the formation or action of mediators are being developed.²¹

Specific blockade of the proinflammatory cytokines interleukin-1 (IL-1) or tumor necrosis factor (TNF) reduces the morbidity and mortality associated with septic shock. Use of neutralizing antibodies to TNF or to IL-1 receptors have reduced the consequences of infection and inflammation, including lethal outcomes in animal models. Soluble TNF and IL-1 surface receptors, which bind their respective cytokines, also ameliorate disease processes. Current clinical trials are evaluating the safety and efficacy of these anticytokine therapies either alone or together.²⁰

Leonard and cols.¹⁶ supported the hypothesis that the potassium channel determines membrane potential in non-activated human T-lymphocytes and that block of this channels is sufficient to cause depolarization and prevent activation by mitogen.

High affinity blockers have been used to demonstrate that blockade of this channels depolarizes the T cell membrane and attenuates the Ca^{++} signaling pathway that is crucial for lymphocyte activation.^{22,23,24} Because T lymphocytes must be activated to initiate and support the immune response, T lymphocytes of this channels represents a valid therapeutic target for the discovery of antiinflammatory drugs, as supported by the suppression of T lymphocytes.¹¹

TNF elicited a 2-and-5-fold increases in K^{+} and Cl^{-} currents, respectively, in HTC cells. These increases occurred within 5-10 min after TNF exposure and were inhibited either by intracellular Ca^{++} chelation. Data suggest that activation of K^{+} and Cl^{-} channels is an early

response to TNF signaling and that channel opening is Ca^{++} -and PKC-dependent. These results findings further suggest that K^+ and Cl^- channels participate in pathways leading to TNF-mediated cell death and thus represent potential therapeutic targets to attenuate liver injury from TNF.²⁵

Effects of TNF on cell function contribute, in a number of ways, to the defense of the organism against infectious agents and to recovery from injury. However, in certain pathological situations, some of these effects may become detrimental, causing even more harm than the pathogen which induced the formation of TNF.^{1,2}

In the sequence of molecular events that take place in the response of the cell to TNF, the most readily accessible to modulation is the initiation of this process, triggered by the binding of TNF to its cell surface receptors. One way of modulating this interaction is by inducing changes in the expression of the TNF receptors.

We investigated the effect of sulfonylureas Chlorpropamide and Fructose-1,6-bisphosphate on PMBC proliferation. Our results show that Chlorpropamide and FBP has an important immunomodulatory effect. Increase concentrations of chlorpropamide and FBP were associated with a proportional reduction of T-lymphocyte proliferation. From the same form that to Chlorpropamide and FBP were associated with a proportional reduction of T-lymphocyte proliferation and soluble receptors of IL-2,⁹ they caused also a diminution of the levels of soluble TNF receptors (sTNFRII). The doses of 1.25/2.5mM of FBP and 5mM/2.5mM of Chlorpropamide caused a significant diminution of those receptors regarding the controls.

Our hypothesis is that from the same form that to activation of lymphocytes, the liberation of the soluble TNF receptors be related to potassium channels. The possible

explanation could be that the FBP interacted with cell membranes, modifying the ion permeability. In presence of FBP, the passive and active K⁺ effluxes in hepatocytes decreased.¹⁰ The Chlorpropamide also blockade the potassium channels, of that form, we suggest that the drug can have the same mechanism from the FBP upon inhibit the cellular proliferation and diminish the levels of sTNF RII.

In conclusion, the results suggest that so much to FBP as regards Chlorpropamide they inhibit the cellular proliferation and the levels of TNF RII and that can be related with the blockade of the channels of potassium, of that form acting as powerful agents on immunomodulation.

REFERENCES

- 1 Beutler B, Cerami A. Tumor Necrosis, Cachexia, Shock, and Inflammation: A Common Mediator. *Annu Rev Biochem* 1988; **57**:505-518.
- 2 Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 1991; **266**(12):7313-6.
- 3 Dembic Z, Loetscher H, Gubler U, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Lesslauer W. Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. *Cytokine* 1990; **2**(4):231-7.
- 4 Seckinger P, Isaaz S, Dayer JM. Purification and biologic characterization of a specific tumor necrosis factor alpha inhibitor. *J Biol Chem* 1989; **264**(20):11966-73.
- 5 Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**(11):4845-9.
- 6 Porteu F, Nathan C. Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils. *J Exp Med* 1990; **172**(2):599-607.
- 7 Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med* 1992; **175**(2):323-9.

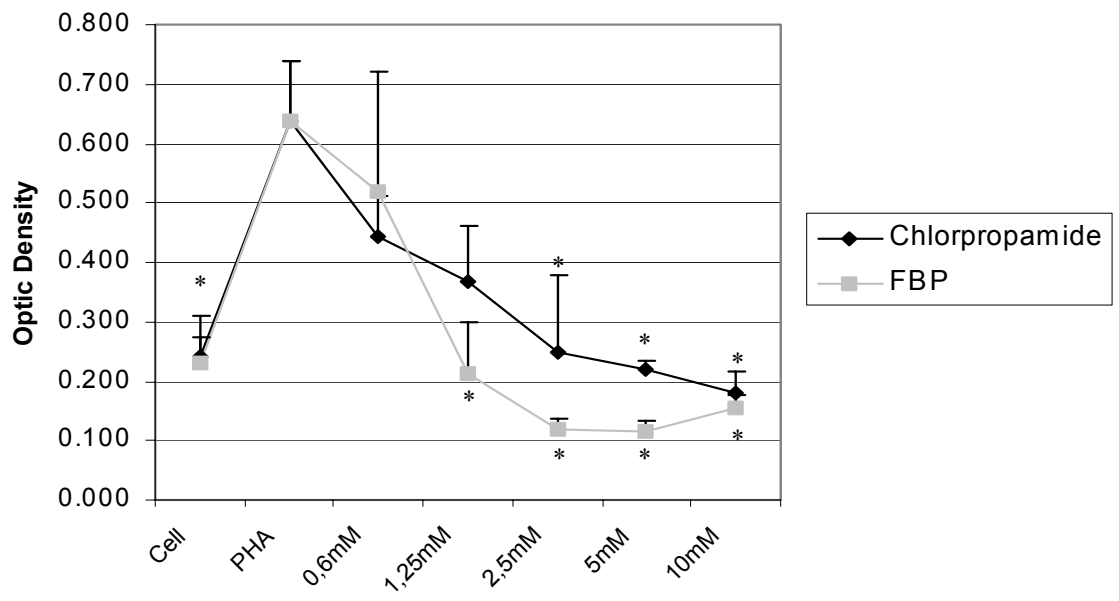
- 8 Oliveira JR, Rosa JL, Ambrosio S, Bartrons R. Effect of Galactosamine on Hepatic Carbohydrate Metabolism: Protective Role of Fructose 1,6-Bisphosphate. *Hepatology* 1992; **15**:1147-1153.
- 9 Nunes FB, Graziottin CM, Alves Filho JCF, Lunardelli A, Caberlon E, Peres A, De Oliveira. Immunomodulatory effect of fructose 1,6 bisphosphate on T-lymphocytes. *Int Immunopharmacology* 2003; 267-272.
- 10 Roig T, Bartrons R, Bermúdez J. Exogenous fructose-1,6-bisphosphate reduces K⁺ permeability in isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1997; **273**:C473-C478.
- 11 Grinstein S, Clarke CA, DuPre A, Rothstein A. Volume-induced increase of anion permeability in human lymphocytes. *J Gen Physiol* 1982; **80**:801-823.
- 12 Ashcroft FM, Gribble FM. Tissue-specific effects of sulfonylureas: lessons from studies of cloned K(ATP) channels. *J Diabetes Complications* 2000; **14**:192-6.
- 13 Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods* 1983; **65**:55-63.
- 15 Bauer ME, Papadopoulos A, Poon L, Perks P, Lightman SL, Checkley S, Shanks N. Altered glucocorticoid immunoregulation in treatment resistant depression. *Psychoneuroendocrinology* 2003; **128**:49-65.
- 16 Sigal NH, Dumont FJ. Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction. *Annu Rev Immunol* 1992; **10**:519-60.
- 16 Leonard RJ, Garcia ML, Slaughter RS, Reuben JP. Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes: mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**:10094-8.
- 17 Bono MR, Simon V, Roseblatt MS. Blocking of human T lymphocyte activation by channel antagonists. *Cell Biochem Funct* 1989; **7**: 219-26.
- 18 Price M, Lee SC, Deutsch C. Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**:10171-5.
- 19 Koo GC, Blake JT, Talento A, et al. Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J Immunol* 1997; **158**: 5120-8.
- 20 Dinarello CA. The Proinflammatory Cytokines Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor and Treatment of the Septic Shock Syndrome. *J Infect Dis* 1991; **163**:1177-1184.
- 21 Parrillo JE. Mechanisms of disease. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *The New England J of Med* 1993; **328**(20):1471-1477.

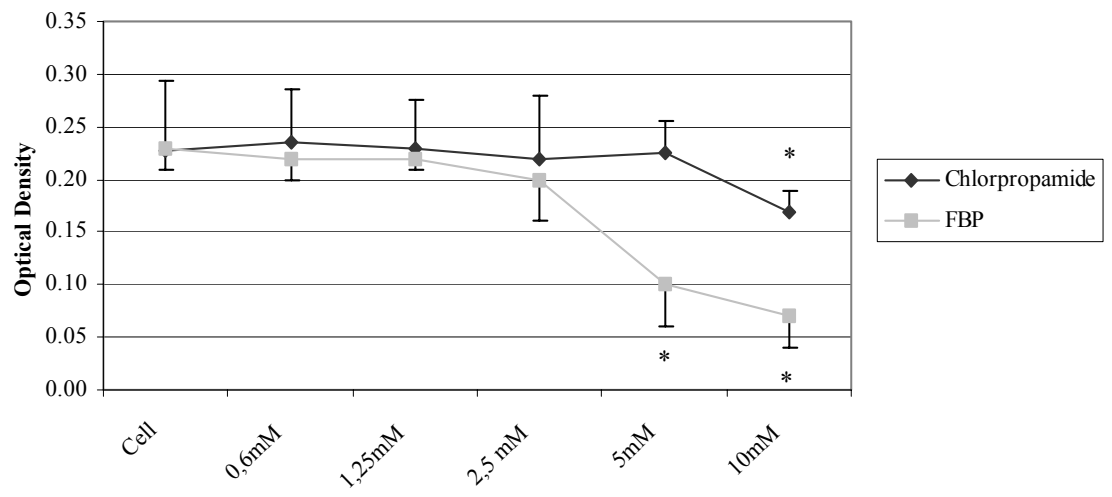
- 22 Gelfand EW, Cheung RK, Grinstein S. Role of membrane potential in the regulation of lectin-induced calcium uptake. *J Cell Physiol* 1984; **121**:533-9.
- 23 Gelfand EW, Cheung RK. Dissociation of unidirectional influx of external Ca^{2+} and release from internal stores in activated human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1990; **20**:1237-41.
- 24 Cahalan MD, Chandy KG. Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr Opin Biotechnol* 1997; **8**:749.
- 25 Nietsch HH, Roe MW, Fiekers JF, Moore SL, Lidofsky SD. Activation of potassium and chloride channels by tumor necrosis factor alpha. Role in liver cell death. *J Biol Chem* 2000; **275**(27):20556-61

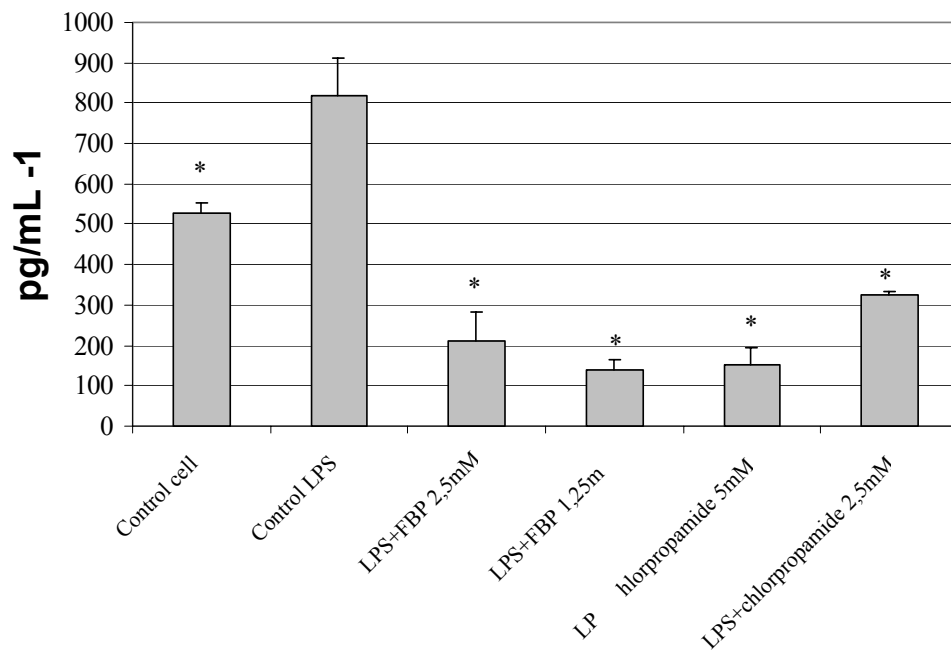
Figure 1: Immunomodulatory effect of Chlorpropamide and Fructose-1.6-bisphosphate on T-lymphocytes stimulated with PHA. PBMCs were stimulated for 96h with PHA and varying concentration of chlorpropamide and FBP. Proliferation was measured using colorimetric MTT assay. Results are expressed as optical density by mean \pm SEM of quadruplicate cultures. An asterisk denotes any response that is significantly different ($P < 0.05$) from the control group (stimulated with PHA).

Figure 2: Cytotoxicity effect of Chlorpropamide and Fructose-1.6-bisphosphate in PBMCs. PBMCs was incubated for 96h with varying concentration of Chlorpropamide and FBP. The cellular viability was performed by trypan blue dye exclusion. The results are presented as percentage by mean \pm SEM of quadruplicate cultures. An asterisk denotes any response that is significantly different ($P < 0.05$) from the control group.

Figure 3: Levels of soluble TNF receptors (sTNFR_{II}) in the presence of Chlorpropamide and Fructose-1,6-bisphosphate. Culture supernatants were collected after 24 h of the stimulation with endotoxin (LPS). sTNFR_{II} was determined by ELISA. Results are expressed as mean ± S.D. An asterisk denotes any response that is significantly different ($P < 0.05$) from the control group (stimulated with LPS).







Efeito da Clorpropamida e Frutose-1,6-bisfosfato em Níveis de Receptores Solúveis Tipo II de FNT

Fernanda B. Nunes, José Carlos F. Alves-Filho, Carolina M. Alves Bastos, Paola M. Tessele, Eduardo Caberlon, Karla B. Moreira, Taísa M. Ferreira e Jarbas R. de Oliveira. Laboratório de Pesquisa em Biofísica, Departamento Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

* Correspondência para o autor:

Dr. Jarbas R. de Oliveira

Laboratório de Pesquisa em Biofísica

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 12C - Sala 263 - C.P.1429

Porto Alegre - RS - o Brasil

Telefone: + 55 51 3320 3500, ramal: 4147

FAX: + 55 51 3320-3612

E-mail: jarbas@puers.br

RESUMO

O choque séptico representa um exemplo da resposta inflamatória exacerbada. As citocinas inflamatórias representam um papel central na patogênese do choque séptico, e futuras terapias poderão depender do controle dos efeitos destas citocinas. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito de duas drogas, Frutose-1,6-Bisfosfato (FBP), um metabólito glicolítico de alta energia, e a Clorpropamida (sulfonilureia) na proliferação de linfócitos T e nos níveis de receptores solúveis de FNT (sFNTRII). Células mononucleares do sangue periféricas (PMBCs) foram isoladas de humanos saudáveis através de um gradiente de centrifugação. Os linfócitos T foram estimulados durante 96 h com fitohemaglutinina (PHA) e por 24 h com lipopolissacarídeo (LPS) sendo utilizadas concentrações variadas de Clorpropamida e FBP. A Clorpropamida nas concentrações entre 2,5 e 10mM e FBP nas concentrações entre 1,25 e 10mM diminuíram a proliferação linfócitos T. A Clorpropamida reduziu a viabilidade celular na concentração 10mM e a FBP nas concentrações de 5,0 e 10mM. Os níveis de sTNFRII foram reduzidos com a Clorpropamida nas concentrações entre 5mM e 2,5 mM e FBP entre 1,25 e 2,5 mM. Os resultados sugerem que tanto a Clorpropamida como a FBP inibem a proliferação celular e os níveis de sTNFRII e, esses resultados podem estar relacionados com o bloqueio dos canais de potássio, dessa forma agindo como potentes agentes na imunomodulação.

INTRODUÇÃO

O choque séptico representa um exemplo da resposta inflamatória exacerbada. Os efeitos sistêmicos de sepse são causados principalmente pelas citocinas endógenas que são normalmente benéficas ao organismo quando estão limitadas ao local de infecção; porém, elas são frequentemente letais quando entram na circulação. O alvo principal das citocinas circulantes são leucócitos, células do endotélio e o coração. Citocinas inflamatórias tem um papel principal na patogênese do choque séptico, e futuras terapias poderão intervir nos efeitos destas citocinas. As complicações do choque estão principalmente relacionadas com a liberação do LPS, um lipopolissacarídeo oriundo de bactérias gram-negativas durante a infecção. Atualmente considera-se que a maioria dos efeitos hemodinâmicos provocados pelo LPS seja pela indução da síntese e liberação de FNT pelos macrófagos. O FNT desempenha um papel benéfico como mediador de resistência às infecções e na formação de tumores. Porém, a super produção ou expressão imprópria destes fatores podem conduzir a uma variedade de condições patológicas, incluindo a toxicidade sistêmica e o choque séptico.^{1,2}

As ações do FNT são produzidas após fatores ligantes específicos agirem nos receptores de superfície da célula. Foram identificados e clonados dois receptores distintos de FNT. Todos os tipos de células estudadas mostraram a presença de um ou ambos os tipos de receptores (FNTRII - 75 kDa e FNTI - 55 kDa).² Os dois tipos de receptores são imunologicamente distintos, mas seus domínios extracelulares têm mostrado semelhanças nos padrões dos quatro domínios de locações residuais de cisteína.³ Os domínios intracelulares dos dois tipos de receptores aparentemente não possuem conexão, sugere-se que os mesmos empregam

diferentes vias na transdução dos sinais. Muitos grupos identificaram proteínas ligantes solúveis de FNT em soro e urina de humanos, essas proteínas podem neutralizar as atividades biológicas do FNT- α e FNT- β .⁴ Os mecanismos envolvidos na indução da liberação dos receptores de FNT não estão claros. Estudos relatam que há uma correlação entre o aumento do FNT e os níveis de receptores solúveis, sugerindo que os estímulos que causam o aumento do FNT, também induzam a liberação desses receptores.^{5,6} Foi relatado que em baixas concentrações de FNT, os receptores solúveis podem estabilizar o nível de FNT e aumentar algumas de suas atividades.⁷ Assim é possível que, em determinadas situações, um *pool* de receptores solúveis de FNT possam representar a estabilização e o controle na liberação de FNT.

A Frutose-1,6-bisfosfato (FBP) é um metabólito glicolítico de alta-energia e acredita-se que possui um efeito protetor em células lesadas por agentes tóxicos.⁸ Em estudo recente demonstrou-se que a FBP nas concentrações de 1,2 à 10 mM diminuiu os níveis de receptores solúveis IL-2.⁹ Como conclusão o estudo sugeriu que a FBP possui um efeito imunomodulatório. A possível explicação para isso, poderia estar relacionada com a possível interação da FBP com membranas celulares, modificando a permeabilidade iônica. Na presença de FBP, o efluxo de K^+ por canais passivos e ativos em hepatócitos é diminuído.¹⁰ Sendo a condutância de K^+ através da membrana o principal determinante para o potencial elétrico de linfócitos T, mudanças no mesmo são sugeridas como sendo o início do processo que desencadeia a mitogênese em linfócitos.¹¹ As sulfonilureias tais como a Clorpropamida são administradas em pacientes com diabetes mellitus tipo-2 (diabetes mellitus não-insulino-dependentes, NIDDM), cujo efeito farmacológico baseia-se na indução da secreção de insulina pelo pâncreas. O alvo principal desse fármaco é o canal de potássio ATP-dependente que

desempenha um papel fundamental para ocorrer a secreção de insulina.¹² Nós sugerimos que estas duas drogas (FBP e Clorpropamida) podem agir da mesma maneira, pela propriedade de ambas no bloqueio dos canais de potássio ATP-dependentes. Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que o bloqueio dos canais de potássio, inibem a ativação de linfócitos T, sugerindo que esses canais podem ser um objeto de estudo para o controle da resposta imune. O objetivo deste estudo foi avaliar o uso de drogas alternativas, como a FBP e a Clorpropamida, na proliferação de linfócitos T e nos níveis de sFNTRII que podem estar envolvidos no processo que desencadeia o choque séptico.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação de células sanguíneas periféricas mononucleares (PBMCs)

As PBMCs foram isoladas do sangue de humanos saudáveis através de um gradiente centrifugação em Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norway) e ressuspendidas em RPMI 1640 complementados com 1% penicilina-streptomomicina e 5% soro AB de humanos (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md) a concentração final de células foi de $1,6 \times 10^6$ /ml como previamente descrito.⁹ A contaminação com plaquetas desta solução foi <1%; a viabilidade celular (maior ou igual a 98%) foi realizada através do método de exclusão por trypan blue.

Linfoproliferação

O mitógeno fitohemaglutinina (PHA) (Sigma Chemical CO., St Louis, MO) foi utilizado na proliferação de linfócitos T. A Clorpropamida e FBP foram dissolvidas em RPMI 1640. Foram utilizadas placas de 96 poços (Corning & Corning, NY) para a cultura de PBMCs ($1,6 \times 10^5$ células/poço) estimuladas com o mitógeno (10 mg/ml, PHA). As células receberam

diferentes concentrações de Clorpropamida (0,6 mM à 10 mM) e FBP (0,6 mM à 10 mM) sendo mantidas por 96 h em estufa de CO₂ a 5% com uma temperatura estável de 37°C.

A proliferação dos linfócitos foi determinada pela técnica de MTT previamente descrita.¹³ O MTT (3-[4-5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolium brometo) (Sigma Chemical CO., St Louis, MO) foi dissolvido em RPMI 1640 a 5mg/ml e acrescentado em todos os poços da placa, incubada a uma temperatura de 37 °C por 4 h. Após o tempo de incubação, foi acrescentado isopropanol a todos os poços para dissolver os cristais azuis escuros. Depois de alguns minutos, foi realizada a análise dos resultados através de um leitor Hyperion MicroReader, utilizando um filtro de 570 nm e 630 nm como filtro de referência.

Análise da citotoxicidade

Foram utilizadas placas de 24 poços (Corning & Corning, NY) para incubar PBMCs (1,6 x 10⁵ células/poço) com Clorpropamida e Frutose-1,6-bisfosfato dissolvidas em RPMI 1640. As placas foram mantidas por 96 h a 37°C em estufa 5% de CO₂. A viabilidade celular foi mensurada por método de MTT previamente descrita.¹³ Os resultados são expressos através de porcentagem, utilizando o ± DP das amostras em quadruplicata.

Análise dos níveis de receptores solúveis tipo II de FNT (sFNTRII)

A produção de sFNTRII foi avaliada através da mensuração em sobrenadantes de PBMCs à uma concentração de 1,6 x 10⁵ célula/poço incubados em meio de cultura durante 24 horas à 37°C em estufa de CO₂ a 5%.¹⁴ As células foram incubadas em placas de 24 poços e receberam tratamentos distintos: (i) não estimuladas; (ii) estimuladas com endotoxina (LPS) (*Escherichia coli*, Sigma, concentração final de 0,1 mg/ml) para dosar os receptores solúveis tipo II de FNT (sFNTRII, 24 h); (iii) estimuladas (LPS) mais solução de Frutose-1,6-bisfosfato

nas concentrações de 2,5mM e 1,25mM; (iv) estimuladas (LPS) mais Clorpropamida nas concentrações de 5mM e 2,5mM. Essas concentrações foram escolhidas pelo efeito supressor demonstrado na proliferação linfocitária. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 900 g por 15 min e os sobrenadantes removidos e armazenados em eppendorfs sendo congelados em freezer a - 70°C até o processamento das análises. Foram utilizados kits comerciais ELISA (R&D,UK) para medir as concentrações de receptores solúveis tipo II de FNT. Foi utilizado um leitor de ELISA (Biorad, UK) com um filtro de 450 nm. Todos os padrões e amostras foram testadas em quadruplicata. As concentrações de sFNTRII foram expressas em pg/ml.

Análise estatística

As diferenças entre os grupos foram testadas por análise de variância (ANOVA) utilizando o programa SPSS 9.0 for Windows (8.0). Os resultados foram expressos através da média \pm EP de todas as amostras em quadruplicata. O $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Efeito imunomodulatório da Clorpropamida e FBP em linfócitos T estimulados com PHA

Primeiramente avaliamos in vitro o efeito imunomodulatório da clorpropamida e FBP em linfócitos T estimulados com PHA (10 mg/ml). Os resultados expressos na Figura 1 mostram que a Clorpropamida nas concentrações entre 2,5 mM e 10 mM e a FBP nas concentrações entre 1,25 mM e 10 mM diminuíram significativamente a proliferação linfocitária ($P < 0.05$).

Efeito citotóxico da Clorpropamida e FBP em PBMCs

Investigamos a viabilidade celular para determinar se o efeito inibitório da Clorpropamida e da Frutose-1,6-bisfosfato na linfoproliferação era devido a morte celular. Como demonstrado na Figura 2, a Clorpropamida reduziu significativamente ($P < 0.05$) a viabilidade celular somente na concentração de 10 mM e a Frutose-1,6-bisfosfato nas concentrações de 5 mM e 10 mM ($P < 0.05$).

Níveis de sFNTRII estimulados com LPS

Verificou-se se a Clorpropamida e a FBP poderiam alterar os níveis de sFNTRII após incubação com LPS. Como apresentado na Figura 3, a FBP reduziu significativamente os níveis de sFNTRII nas concentrações de 2,5mM e 1,25mM, e a Clorpropamida nas concentrações de 5mM e 2,5mM ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da Clorpropamida e da FBP na proliferação de linfócitos T e nos níveis de FNTRII. O aumento das concentrações de Clorpropamida e FBP foram associadas com uma proporcional redução na proliferação de linfócitos T.

A regulação da via de sinalização do Ca^{++} em Linfócitos T é um mecanismo que está sendo explorado para modular respostas imunes.¹⁵ As funções *in vitro* de Linfócitos T podem estar suprimidas pela interferência direta dos aumentos de cálcio intracelular, seguida da ativação do TCR (receptor de células T). Em linfócitos T humanos, estas mudanças nos níveis de cálcio requerem, pelo menos em parte, a ativação dos canais de potássio.

Bloqueadores de canais de potássio, como a margatoxina e claribdotoxina despolarizam linfócitos T, e inibem *in vitro* o aumento do cálcio intracelular, a produção de citocinas, e a proliferação de linfócitos T.^{16,17,18} Koo e cols mostraram também que o bloqueio dos canais de potássio inibe a resposta imune *in vitro*.¹⁹

Embora o foco das estratégias anti-citocinas no tratamento do choque séptico seja específico para cada citocina, a redução da síntese de IL-1 ou FNT, reduz as respostas biológicas às ações bacterianas ou inflamação.²⁰ Há três pontos na seqüência da patogênese do choque séptico no qual a terapia pode ser efetiva. Primeiro, o foco da infecção pode ser erradicado com antibióticos apropriados, drenagem cirúrgica, ou ambos. Segundo, a sepse associada a perturbações cardiovasculares, metabólicas, e disfunção de múltiplos órgãos, podem ser tratadas em UTIs. Terceiro, estão sendo desenvolvidos inibidores dos mediadores tóxicos, tratamentos que inibem a formação ou ação desses mediadores.²¹

O bloqueio específico de citocinas pro-inflamatórias como interleucina-1 (IL-1) ou fator de necrose de tumoral (FNT) reduz a morbidade e a mortalidade associada ao choque séptico. A utilização de anticorpos neutralizadores ou receptores de TNF ou IL-1 reduziram em modelos animais as conseqüências letais frente a infecção e inflamação. Receptores solúveis de superfície se ligam as citocinas FNT e IL-1 e, dessa forma, também podem melhorar a evolução do processo patológico. As terapias clínicas atuais estão avaliando a segurança e eficácia do uso de anti-citocinas isoladas ou em conjunto.²⁰

Leonard e cols apoiaram a hipótese que o canal de potássio determina o potencial de membrana em linfócitos T humanos não ativados e que o bloqueio desses canais é suficiente para causar a despolarização e prevenir a mitogênese.¹⁶

Foram utilizados bloqueadores de alta afinidade para demonstrar que a despolarização da membrana de células T atenua a entrada de Ca^{++} que é crucial para sinalização da ativação de linfócitos.^{22,23,24} Pelo papel desempenhado pelos linfócitos T na resposta imune, esses canais podem ter importância terapêutica, na descoberta de drogas antiinflamatórias, apoiadas pela supressão de linfócitos T.¹¹

O FNT aumenta 2 a 5 vezes as correntes de K^+ e Cl^- , respectivamente, em células HTC. Estes aumentos aconteceram cerca de 5-10 min após a exposição ao FNT e foram inibidos pela quelação do Ca^{++} intracelular. Dados sugerem que ativação dos canais de K^+ e Cl^- são uma resposta precoce à sinalização do FNT e abertura dos canais de Ca^{++} -e PKC-dependentes. Esses sugerem que os canais de K^+ e Cl^- participam das vias que conduzem a morte celular mediada por FNT e assim, representam potenciais medidas terapêuticas para atenuar os danos causados pelo FNT *in vivo*.²⁵

Os efeitos do FNT nas células contribuem, de vários modos, para a defesa do organismo contra agentes infecciosos e na recuperação dos danos. Porém, em certas situações patológicas, estes mesmos efeitos podem ser prejudiciais, causando mais danos que o próprio patógeno que induziu a formação do FNT.^{1,2}

Na seqüência dos eventos moleculares que são desencadeados pela resposta da célula ao FNT, o responsável pela modulação é a iniciação do próprio processo, quando ocorre a ligação do FNT aos receptores de superfície da célula. Uma das vias para modular esta interação pode ser decorrente da mudança na expressão dos receptores do FNT.

Investigamos o efeito da Clorpropamida e da Frutose-1,6-bisfosfato na proliferação de células mononucleares periféricas. Nossos resultados mostram que a Clorpropamida e a FBP possuem um importante efeito imunomodulatório. O aumento nas concentrações de

clorpropamida e FBP foram associadas com uma proporcional redução na proliferação de linfócitos T. Da mesma forma que a clorpropamida e a FBP reduziram a proliferação de Linfócitos T, essas drogas também causaram a diminuição dos níveis de receptores solúveis de FNT (sFNTRII). As doses de 1,25/2,5mM de FBP e 5mM/2,5mM de Clorpropamida causaram uma diminuição significativa desses receptores em relação aos controles.

Nossa hipótese é de que a ativação de linfócitos e a liberação dos receptores solúveis de FNT estejam relacionadas ao bloqueio dos canais de potássio. A ação dessas drogas na imunomodulação poderia ser então explicada pela interação das mesmas com as membranas das células, modificando a permeabilidade ao íon K^+ . Na presença da FBP, o efluxo passivo e ativo de K^+ em hepatócitos foi diminuído.¹⁰ A Clorpropamida também bloqueia os canais de potássio, sugerindo que o mecanismo de ação seja o mesmo da FBP ao inibir a proliferação celular e diminuir os níveis de receptores solúveis tipo II de FNT.

Esses resultados sugerem que tanto a FBP como a Clorpropamida podem inibir a proliferação celular e os níveis de sFNTRII e essa ação pode ser relacionada ao bloqueio dos canais de potássio, dessa forma agindo como possíveis agentes terapêuticos na imunomodulação.

REFERÊNCIAS

- 1 Beutler B, Cerami A. Tumor Necrosis, Cachexia, Shock, and Inflammation: A Common Mediator. *Annu Rev Biochem* 1988; 57:505-518.
- 2 Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 1991; 266(12):7313-6.
- 3 Dembic Z, Loetscher H, Gubler U, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Lesslauer W. Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. *Cytokine* 1990; 2(4):231-7.

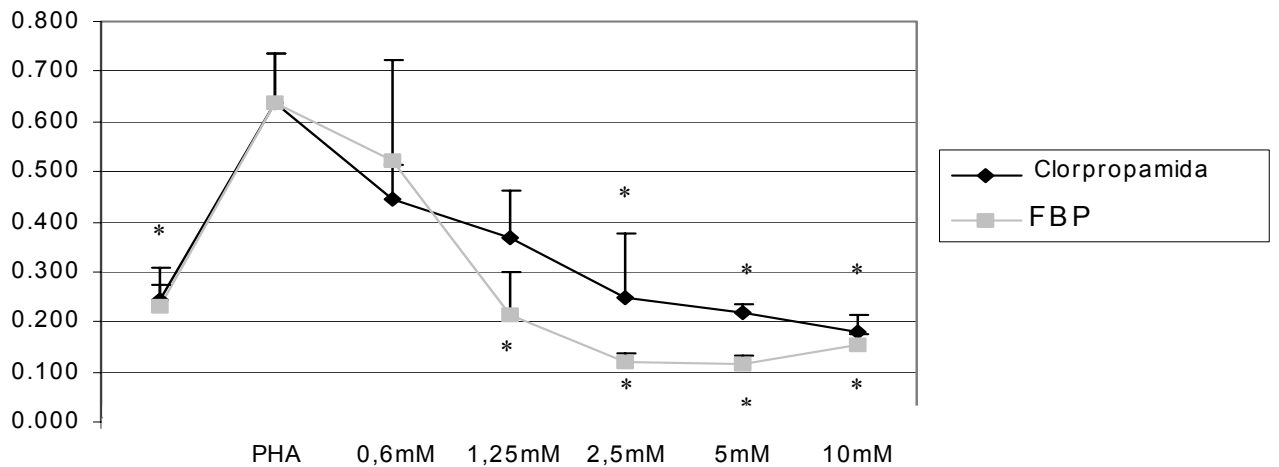
- 4 Seckinger P, Isaaz S, Dayer JM. Purification and biologic characterization of a specific tumor necrosis factor alpha inhibitor. *J Biol Chem* 1989; 264(20):11966-73.
- 5 Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(11):4845-9.
- 6 Porteu F, Nathan C. Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils. *J Exp Med* 1990; 172(2):599-607.
- 7 Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med* 1992; 175(2):323-9.
- 8 Oliveira JR, Rosa JL, Ambrosio S, Bartrons R. Effect of Galactosamine on Hepatic Carbohydrate Metabolism: Protective Role of Fructose 1,6-Bisphosphate. *Hepatology* 1992; 15:1147-1153.
- 9 Nunes FB, Graziottin CM, Alves Filho JCF, Lunardelli A, Caberlon E, Peres A, De Oliveira. Immunomodulatory effect of fructose 1,6 bisphosphate on T-lymphocytes. *Int Immunopharmacology* 2003; 267-272.
- 10 Roig T, Bartrons R, Bermúdez J. Exogenous fructose-1,6-bisphosphate reduces K⁺ permeability in isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1997; 273:C473-C478.
- 11 Grinstein S, Clarke CA, DuPre A, Rothstein A. Volume-induced increase of anion permeability in human lymphocytes. *J Gen Physiol* 1982; 80:801-823.
- 12 Ashcroft FM, Gribble FM. Tissue-specific effects of sulfonylureas: lessons from studies of cloned K(ATP) channels. *J Diabetes Complications* 2000; 14:192-6.
- 13 Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63.
- 14 Bauer ME, Papadopoulos A, Poon L, Perks P, Lightman SL, Checkley S, Shanks N. Altered glucocorticoid immunoregulation in treatment resistant depression. *Psychoneuroendocrinology* 2003; 128:49-65.
- 15 Sigal NH, Dumont FJ. Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:519-60.
- 16 Leonard RJ, Garcia ML, Slaughter RS, Reuben JP. Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes: mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:10094-8.

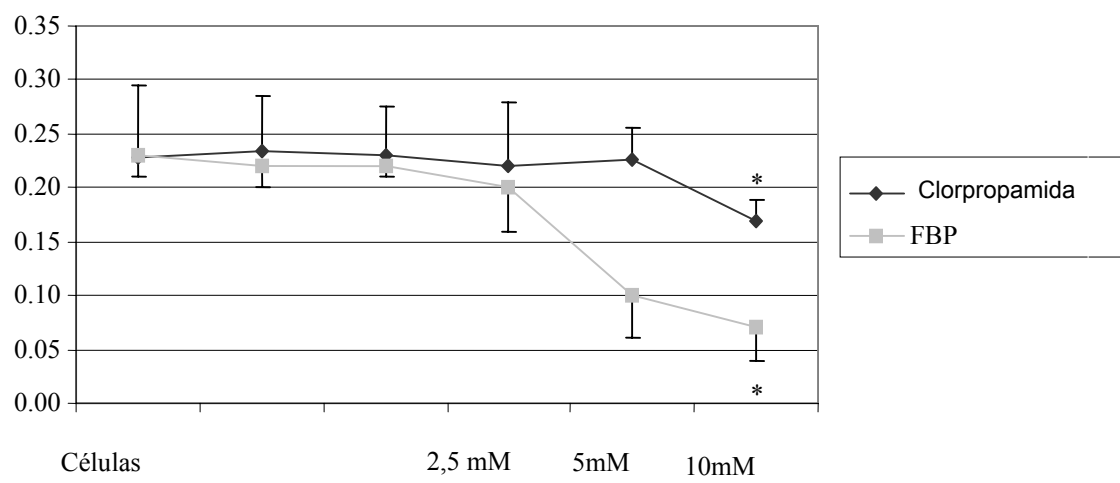
- 17 Bono MR, Simon V, Roseblatt MS. Blocking of human T lymphocyte activation by channel antagonists. *Cell Biochem Funct* 1989; 7: 219-26.
- 18 Price M, Lee SC, Deutsch C. Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:10171-5.
- 19 Koo GC, Blake JT, Talento A, et al. Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J Immunol* 1997; 158: 5120-8.
- 20 Dinarello CA. The Proinflammatory Cytokines Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor and Treatment of the Septic Shock Syndrome. *J Infect Dis* 1991; 163:1177-1184.
- 21 Parrillo JE. Mechanisms of disease. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *The New England J of Med* 1993; 328(20):1471-1477.
- 22 Gelfand EW, Cheung RK, Grinstein S. Role of membrane potential in the regulation of lectin-induced calcium uptake. *J Cell Physiol* 1984; 121:533-9.
- 23 Gelfand EW, Cheung RK. Dissociation of unidirectional influx of external Ca²⁺ and release from internal stores in activated human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1990; 20:1237-41.
- 24 Cahalan MD, Chandy KG. Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr Opin Biotechnol* 1997; 8:749.
- 25 Nietsch HH, Roe MW, Fiekers JF, Moore SL, Lidofsky SD. Activation of potassium and chloride channels by tumor necrosis factor alpha. Role in liver cell death. *J Biol Chem* 2000; 275(27):20556-61.

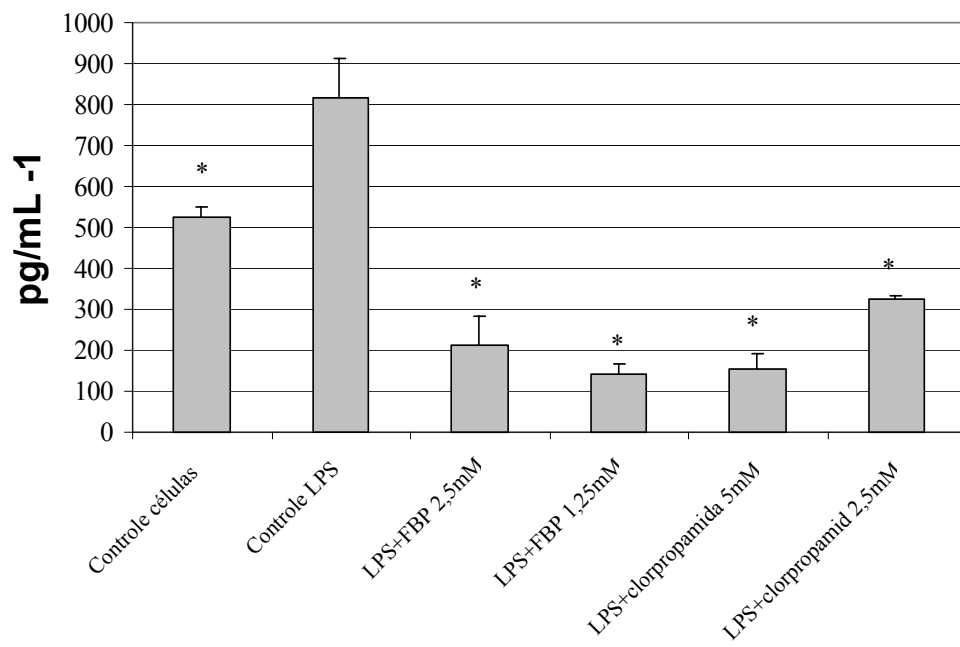
Figura 1: Efeito imunomodulatório da Clorpropamida e Frutose-1,6-bisfosfato em linfócitos-T estimulados com PHA. As células mononucleares foram estimuladas durante 96h com PHA e incubadas em concentrações variadas de Clorpropamida e FBP. A proliferação foi verificada utilizando-se o ensaio colorimétrico de MTT. Os resultados foram aferidos por densidade óptica com média \pm EP de culturas em quadruplicata. O asterisco demonstra diferença significativa ($P < 0.05$) com relação ao grupo estimulado com PHA.

Figura 2: Efeito citotóxico da Clorpropamida e Frutose-1,6-bisfosfato em células mononucleares. As células mononucleares foram incubadas durante 96h com concentrações variadas de clorpropamida e FBP. A viabilidade celular foi verificada pelo método de exclusão trypan blue. Os resultados são apresentados em porcentagem com média \pm EP de culturas em quadruplicata. Os asteriscos demonstram diferenças significativas ($P < 0.05$) com relação ao grupo controle.

Figura 3: Níveis dos receptores solúveis de FNT tipoII (sFNTRII) em presença de clorpropamida e Frutose-1,6-bisfosfato. Os sobrenadantes da cultura foram coletados após 24 h de estimulação com LPS. sFNTRII foi determinado por ELISA. Os resultados são expressos com média \pm D.P. Os asteriscos demonstram diferença significativa ($P < 0.05$) com relação ao grupo estimulado com LPS.







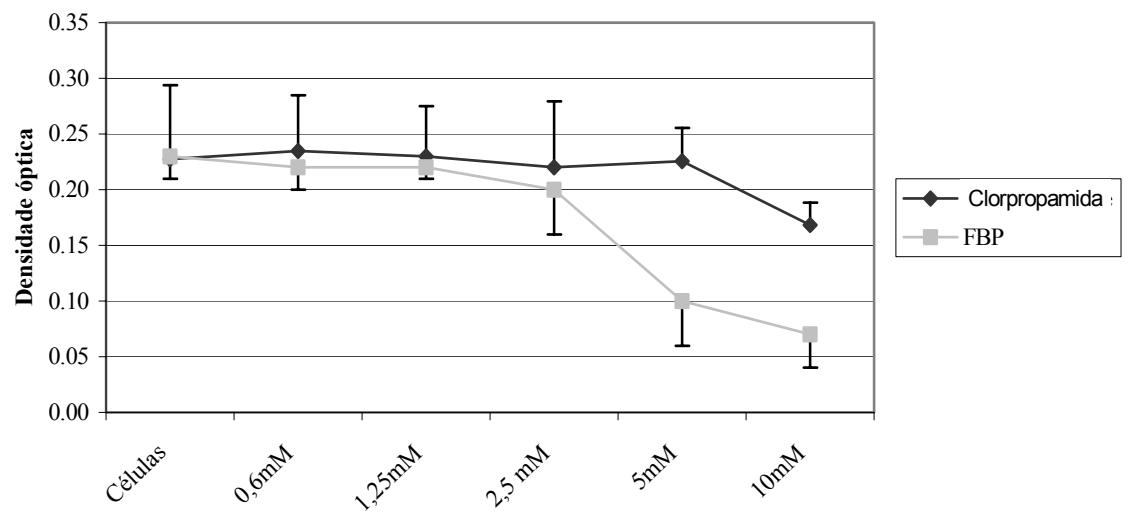
5 - CONCLUSÕES

- Foi comprovado o poder antiinflamatório da Frutose-1,6-bisfosfato ao diminuir o edema nos animais que tiveram a inflamação induzida por carragenina e os níveis de leucócitos dos animais submetidos a sepse experimental.
- A Frutose-1,6-bisfosfato não possui efeito antimicrobiano.
- A Frutose-1,6-bisfosfato possui um efeito quelante ao cálcio iônico.
- A Frutose-1,6-bisfosfato inibe a proliferação dos linfócitos estimulados com PHA e diminui os níveis dos receptores solúveis de IL-2.
- A Frutose-1,6-bisfosfato e a Clorpropamida inibem a proliferação linfocitária em presença de PHA e diminuem os níveis de sFNTRII liberados por linfócitos após estimulação por endotoxina (LPS), sugerindo uma possível ação sobre os canais de potássio.

6 -PERSPECTIVAS FUTURAS

Nosso grupo almeja a realização de estudos clínicos, onde será administrada via endovenosa a Frutose-1,6- bisfosfato em pacientes de UTIs com diagnóstico de sepse. Para tanto, em recente trabalho publicado (ANEXO), determinamos a DL_{50} endovenosa da FBP em animais. Esse trabalho poderá servir no embasamento de doses terapêuticas seguras à serem administradas em humanos.

ANEXOS





Short communication

Intravenous toxicity of fructose-1,6-bisphosphate in rats

Fernanda Bordignon Nunes, Patrick Barcelos Gaspareto, Roberto Christ Vianna Santos, Márcio de Assis, Cássio Meyer Graziottin, Vanderlei Biolchi, José Carlos Farias Alves Filho, Adroaldo Lunardelli, Luís D. Ávila, Melissa Guerra Simões Pires, Paulo Harald Wächter, Jarbas Rodrigues De Oliveira*

Laboratório de Pesquisa em Biofísica, Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681-Prédio 12C-Sala 263-C.P. 1429 Porto Alegre, RS, Brazil

Received 9 September 2002; received in revised form 3 January 2003; accepted 6 January 2003

Abstract

Fructose-1,6-bisphosphate (FBP) is a bisphosphorylated sugar with a protective action against events that lead to cellular damage. The toxicity of the drug was assessed when administered intravenously in Wistar rats in doses of between 250 and 4000 mg/kg. Ionic calcium, total calcium, inorganic serum phosphate and the electrocardiographic profile of these animals were assessed. The lethal dose (LD₅₀) was established by means of PROBIT processing. There was no reduction in the levels of total calcium, with the administration of increased doses of FBP, although there was a significant reduction in the levels of ionic calcium in those groups that received 250 mg/kg and over. The serum phosphate showed a significant statistical increase in those groups that received 750 mg/kg and over. The LD₅₀ obtained in 24 h was 1068 mg/kg. Though it was not possible to elucidate the toxic mechanism of FBP, the electrocardiogram (ECG) showed that all the rats died of cardiac arrest.

© 2003 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Fructose-1,6-bisphosphate; Toxicity; LD₅₀; PROBIT

1. Introduction

Fructose-1,6-bisphosphate (FBP), a high-energy intermediate metabolite of glycolysis (Kirtley and McKay, 1977), has been used therapeutically to attenuate the effects of ischemic injury in the

kidney (Didlake et al., 1985), heart (Lazzarino et al., 1991), liver (Nakai et al., 1991), intestine (Sun et al., 1990), brain (Farias et al., 1990) and lung (Chu et al., 2002).

De Oliveira et al. (1992) also have demonstrated that the simultaneous administration of galactosamine and FBP prevents the hepatitis induced by galactosamine, diminishing the fall in the energy charge and preventing liver cell death. This action of FBP is specific and not shared by other phosphorylated sugars such as glucose-6-phos-

* Corresponding author. Tel.: +55-51-3320-3500x4147; fax: +55-51-3320-3612.

E-mail address: jarbas@puers.br (J.R. De Oliveira).

phate, fructose-6-phosphate, and fructose-1-phosphate or by fructose (De Oliveira et al., 1992). Equivalent doses of fructose and inorganic phosphate did not improve survival, as well as lower doses of FBP (Squadrito et al., 1989). We recently demonstrated that 500 mg/kg of FBP given intraperitoneally improved the survival of rats suffering from sepsis (Nunes et al., 2002).

Information about the mechanism by which FBP can protect cells from damage are contradictory. A simple explanation for the mechanism of exogenous FBP action would be that FBP can enter the cell and act as a glycolytic intermediate capable of producing ATP (Lazzarino et al., 1991). However, alternative mechanisms can explain these effects of FBP. Galzigna and Rigobello (1986) have proposed that FBP acts as a 'membrane stabilizer' by influencing the entry of Ca^{2+} or other cations. Furthermore, FBP has been shown to favor the uptake of K^+ in the heart (Cattani et al., 1984) and to favor the release of H^+ in erythrocytes. Activation of phosphofructokinase resulting from the increased intracellular pH has been suggested to result in an increased concentration of intracellular FBP and ATP as a secondary effect of exogenous FBP administration (Lazzarino et al., 1984). Therefore, the mechanism of action of exogenously administered FBP has remained unclear due to a lack of direct evidence that FBP is capable of crossing the membrane and acting as a glycolytic intermediate (Hardin and Roberts, 1994). Other authors have challenged this explanation, mainly on the basis that sugar phosphates cannot cross the cell membrane (Cattani et al., 1980; Eddy et al., 1981). Reports suggesting that they are based on indirect evidence (Gregory et al., 1989). Another possible explanation could be that the FBP interacted with cell membranes, modifying the ion permeability (Cattani et al., 1980; Hassinen et al., 1981).

Vexler et al. (1999) demonstrated the toxicity of this sugar in neonatal animals. Thus, saline or 4000, 6000 or 8000 mg/kg of FBP was given intraperitoneally to normoxic 7 days old rats. All animals receiving 8000 mg/kg and 27% of those receiving 6000 mg/kg of FBP died. Nineteen percent of pups given 6000 or 8000 mg/kg of FBP had mild perivascular fluid cuffing and/or

microscopic pulmonary haemorrhage. Administering 4000–8000 mg/kg of FBP, significantly decreased Ca^{2+} concentrations and increased PO_4^{3-} concentrations. FBP chelates Ca^{2+} and reduces ionized $[\text{Ca}^{2+}]$ inversely proportional to the FBP concentration. This could reduce calcium influx through NMDA receptors. Indeed, Ca^{2+} uptake is reduced in both myocardial tissue and spermatozoa in the presence of FBP (Galzigna, 1989).

Markov mentions a mean lethal dose (LD_{50}) of 5.8–6.0 g/kg of FBP when applied in dogs by intravenous via at a rate of 500 mg/min (Markov et al., 1997). Experiments in humans were conducted with FBP in doses of 63–250 mg/kg administered by intravenous via at a rate between 200 and 750 mg/min where no collateral effect was verified (Markov et al., 2000).

There are a number of studies that uses FBP in single dose in the treatment of situations such as cases of ischemia, toxicity, infections, inflammations and in situations of cellular energy deficit. The mean LD_{50} for the drug when applied intravenously in bolus, had not, yet been reported, for which reason it was decided to conduct the present study.

2. Materials and methods

The tests were conducted in accordance with the National Institute of Health Policy Guidelines on Animal Care. Anesthesia was performed with 30 mg/kg of sodium thiopental (Thionembutal-Abbott). Fed, male Wistar rats weighing an average 260 g (S.D. = 40) were used.

The animals were chosen at random to receive a dose of FBP (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) or saline solution (NaCl 0.9%) (Rasa, Brazil). The animals received saline solution ($n = 5$) (Control Group), 250 mg/kg ($n = 5$), 500 mg/kg ($n = 9$) 750 mg/kg ($n = 9$), 850 mg/kg ($n = 8$), 1000 mg/kg ($n = 8$), 2000 mg/kg ($n = 9$) and 4000 mg/kg ($n = 4$) of FBP for the toxicity studies. All the animals received a single intravenous injection (caudal vein) in a mean volume of 1 ml applied in bolus, and took approximately 10 s to administer, the pH of the injected solution was 5.5.

Table 1
Percentage of mortality according to the dose administered

Dose (mg/kg)	Death (%)	Log dose	PROBIT Obs.	PROBIT Corr.	PROBIT Exp.	Percentage of Exp. (ei)	Percentage of Obs. (oi)
250	0.00	2.398	2.0590	1.9098	1.9722	0.13	0.17
500	8.33	2.699	3.6148	3.6148	3.4175	5.68	8.33
750	28.57	2.875	4.4369	4.4369	4.2625	23.03	28.57
850	9.10	2.929	3.6654	3.6654	4.5218	31.62	9.10
1000	66.67	3.000	5.4316	5.4316	4.8627	44.54	66.67
2000	90.00	3.301	6.2816	6.2816	6.3080	90.45	90.00
4000	100.00	3.602	–	7.7478	7.7532	99.70	99.00

Obs., observed; Corr., corrected; Exp., expected.

For the biochemical analysis, calcium serum (Labtest Diagnostic, Brazil), inorganic phosphate serum (Diagnostic Merck, Germany) and ionic calcium (Easylyle Calcium Analyzer, Medical Corporation, USA) dosages were performed. In order to determine the total calcium, we used the cresolphthalein method. The ionic calcium was measured using the ion-selective electrode. For the inorganic phosphate we used the method that compounds the inorganic phosphate with phosphomolybdate, this compound is determined by photospectrometry at 340 nm. In order to obtain the blood sample, the caudal vein was punctured with a 25G scalpel (Becton-Dickinson, Brazil).

The statistical significance analysis (Oneway ANOVA) was carried out using the SPSS 9.0 for Windows. The mean LD₅₀ was established using

statistical processing from PROBIT (Fisher, 1971; Tallarida et al., 1987).

In order to verify the effect of FBP on the depolarization of the heart, electrocardiograms (ECG) were performed on the animals, using the C10 equipment (TEB Brazil) and the derivation D2. The animals ($n=6$) received 1000 mg/kg of FBP. In an attempt to test the hypothesis that the cause of death of the animals was the chelation of the ionic calcium by the FBP, ECGs were performed on the rats that received 1000 mg/kg of ethylenediaminetetraacetic acid tripotassium salt trihydrated (EDTA) ($n=6$). In an attempt to verify whether the death of the animals had been caused by the elevation of phosphate serum levels, ECGs were performed on the rats ($n=6$) that received 3000 mg/kg of disodium phosphate acid

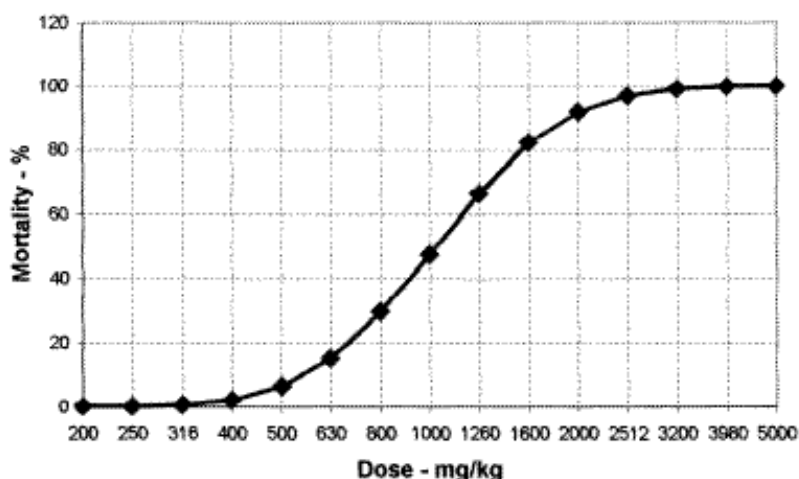


Fig. 1. PROBIT curve that relates the mortality to the FBP dose.

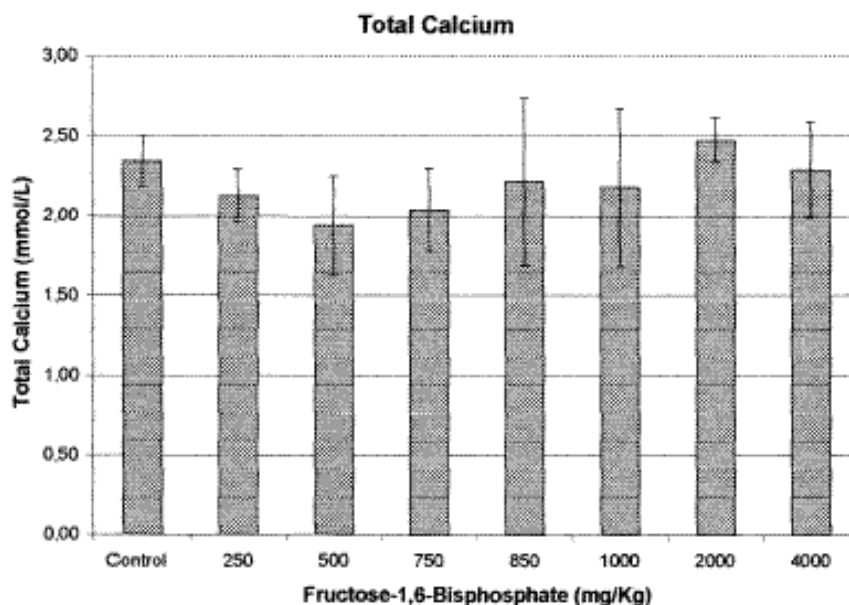


Fig. 2. Total calcium concentration in the different groups that received FBP.

(Na_2HPO_4). We injected 1000 mg/kg of EDTA (trihydrate-390.2) because this concentration corresponds to 2.5 mM, that is, the same (molarity) as the FBP solution that was used. With this regard the disodium phosphate, we injected 1000 mg/kg, because such a solution is equivalent to 5.1 mM FBP (2.5 mM) when hydrolyzed, releases two phosphates, therefore, the concentration of both is same, corresponding to a similar power of plasmatic phosphate increase.

3. Results

3.1. Calculation of LD_{50}

The animals received a dose of FBP or saline solution. The doses of FBP were 250, 500, 750, 850, 1000, 2000 and 4000 mg/kg. In Table 1 we can see the data used for the calculation of LD_{50} . Once having the dose/death data, presented in Table 1, the calculations of LD_{50} and the respective confidence interval were established according to the procedures proposed by Tallarida et al. (1987) from which the mean LD_{50} of (PROBIT = 5.0) of

1068 [895–1274] mg/kg for the FBP when applied by intravenously in Wistar rats, with 95% of confidence. In Fig. 1, it is possible to see the mortality curve related to dosage.

3.2. Biochemical analysis

Recent studies have shown the capacity of FBP to chelate ionic calcium and increase the plasmatic levels of phosphate (Vexler et al., 1999). We therefore assessed the serum concentrations of total calcium, ionic calcium and phosphate. The results can be seen in Figs. 2, 3 and 5.

The measurement of the levels of total calcium showed there was no reduction, when the higher doses of FBP were administered (Fig. 2), although, in the assessment of the concentration of ionic calcium, there was shown to be a significant reduction in the concentration of this parameter in concentrations of over 250 mg/kg ($P < 0.05$) (Fig. 3). In order to verify whether the reduction in plasmatic ionic calcium was responsible for death of the animals, a correlation was made between the mortality rate and the plasmatic ionic calcium. This indicated a low correlation ($R=0.35$) (Fig. 4).

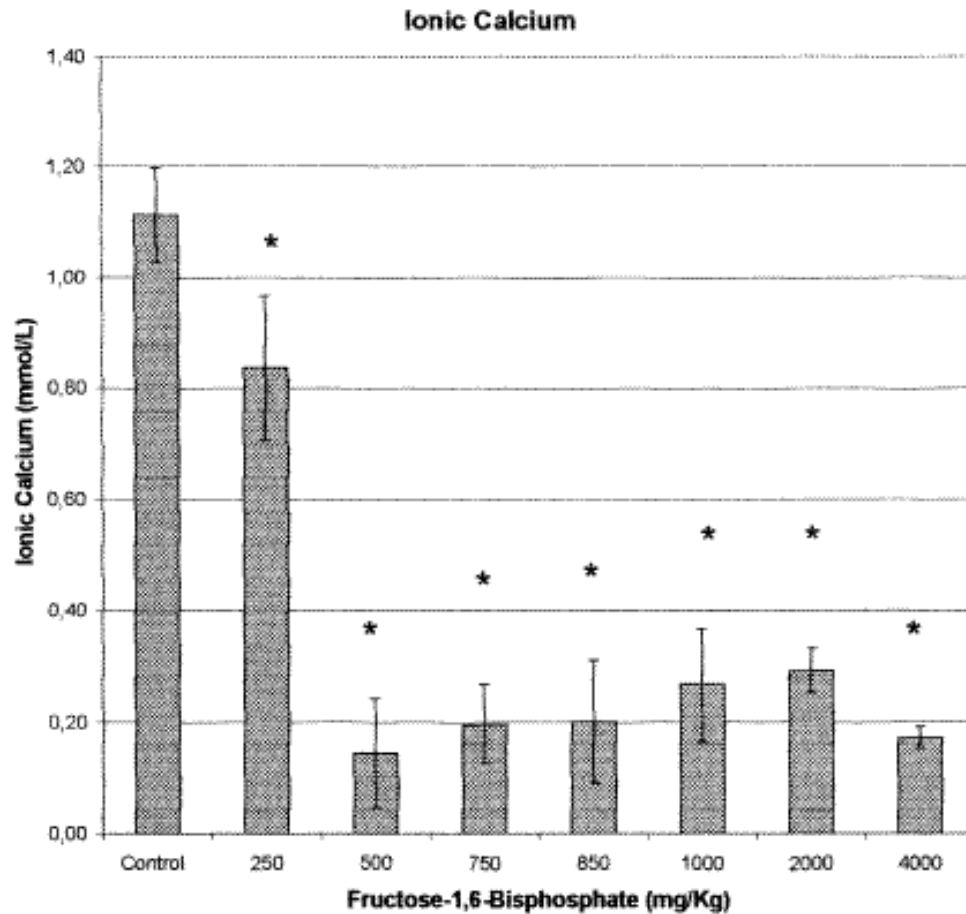


Fig. 3. Ionic calcium concentration in the different groups that received FBP. Significant statistical differences ($P < 0.05$) between the groups that received FBP and the control group are represented by *.

The levels of serum phosphate showed a gradual increase, with significant increases occurring in the groups that received FBP in doses of 750 mg/kg and over. The solution of phosphate (1000 mg/kg) provoked the mortality of all the animals. Although there was a fall in the plasmatic levels of phosphate in the 2000 mg/kg group, this rate was not considered significant when compared with the other groups (Fig. 5). In order to test the possible influence of phosphate in the death of the animals, a correlation was made between the phosphate and the mortality rate of the animals (Fig. 6). The correlation co-efficient was 0.70, suggesting that the death of the animals may have been by the high levels of phosphate.

Given these results, it was decided to obtain an electrocardiographic profile of the animals that received FBP.

3.3. Electrocardiographic findings

The animals used in this study died as a result of diastolic cardiac arrest. In order to detect alterations, ECG were performed on these animals, as can be seen in Fig. 7.

No similarity was found between the ECGs from these groups, demonstrating that despite the existence of a strong correlation between mortality and the increase in phosphate, the mortality caused by FBP was not due to an increase in plasmatic phosphate.

Regarding the EDTA injections, this experiment was done in order to obtain more data that might confirm the theory that hypocalcemia, which can be provoked by FBP, was not the cause of death of the animals. The difference between the ECGs of the FBP solution group and the EDTA solution

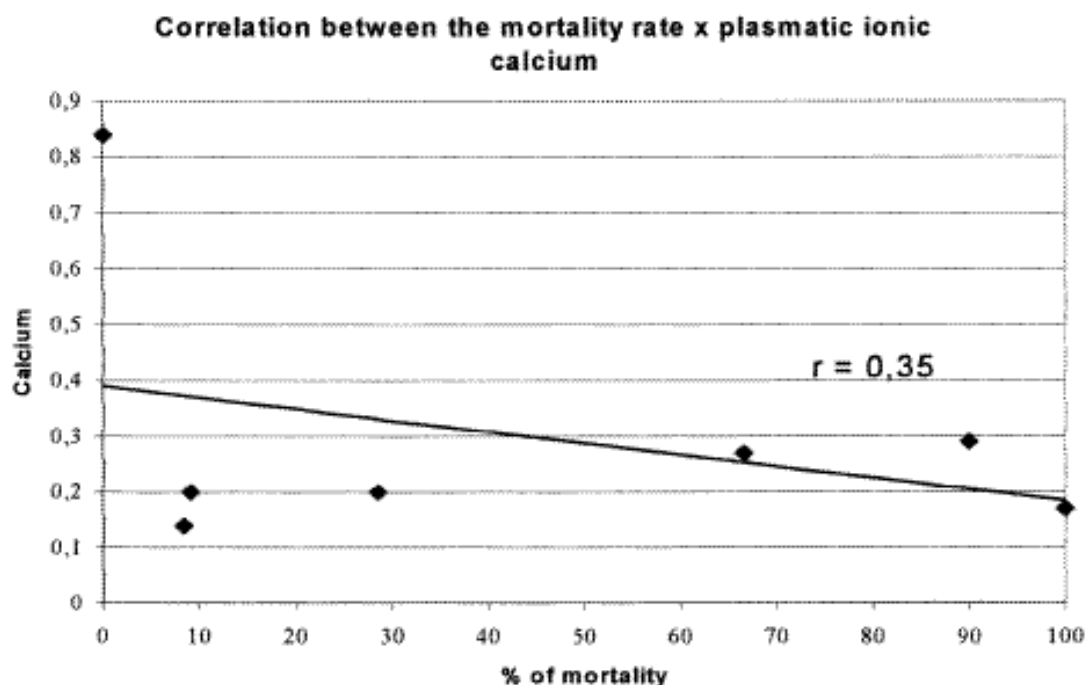


Fig. 4. Index of correlation between the mortality rate and the plasmatic ionic calcium. This indicated a moderate correlation ($r = 0.35$).

group represents strong evidence to prove that this was indeed the case.

4. Discussion

The application of a drug intravenously in bolus is shown to be an important characteristic in the production of a concentration peak in the blood circulation, allowing the medicine to reach vital organs such as the heart and lungs in a concentrated form, before there is time for dilution to occur in the liquids of the various corporeal compartments (Shargel and Yu, 1999). For this reason, it is suggested that in dealing with a highly polar drug, such as FBP, this high transitory concentration may produce important cellular disturbances that may lead to the death of the animal.

The data obtained for the calculation of the LD_{50} were processed statistically in order to verify consistency, significance and adherence, with the aim of establishing, through statistical projection, the dose that would have a greater than 95%

probability of killing 50% of the individuals in a model group within 24 h (LD_{50}). In our study we found that the dose of FBP administered intravenously, that led to the death of more than 50% of the rats within 24 h was 1068 mg/kg. The statistical processing used was PROBIT.

The first hypothesis raised would be due to the chelation of the ionic calcium (Fig. 3) caused by the FBP. The reduction in plasmatic ionic calcium may provoke convulsions and cardiac fibrillation, leading to death (Bellet and Jedlicka, 1969). Studies using EDTA to provoke hypocalcemia report a reduction in sinoatrial node automatism and reduced ventricular frequency. In some cases, hypocalcemia has caused cardiac fibrillation and death (Bellet and Jedlicka, 1969). In order to explore this hypothesis, a 1000 mg/kg dose of EDTA was used. The administration of EDTA provoked the death of the animals and the electrocardiographic profile was compatible with hypocalcemia (Surawicz et al., 1959).

In Fig. 5, we observe an increase in the plasmatic concentration of phosphate, followed by an increase in the rate of death that can be

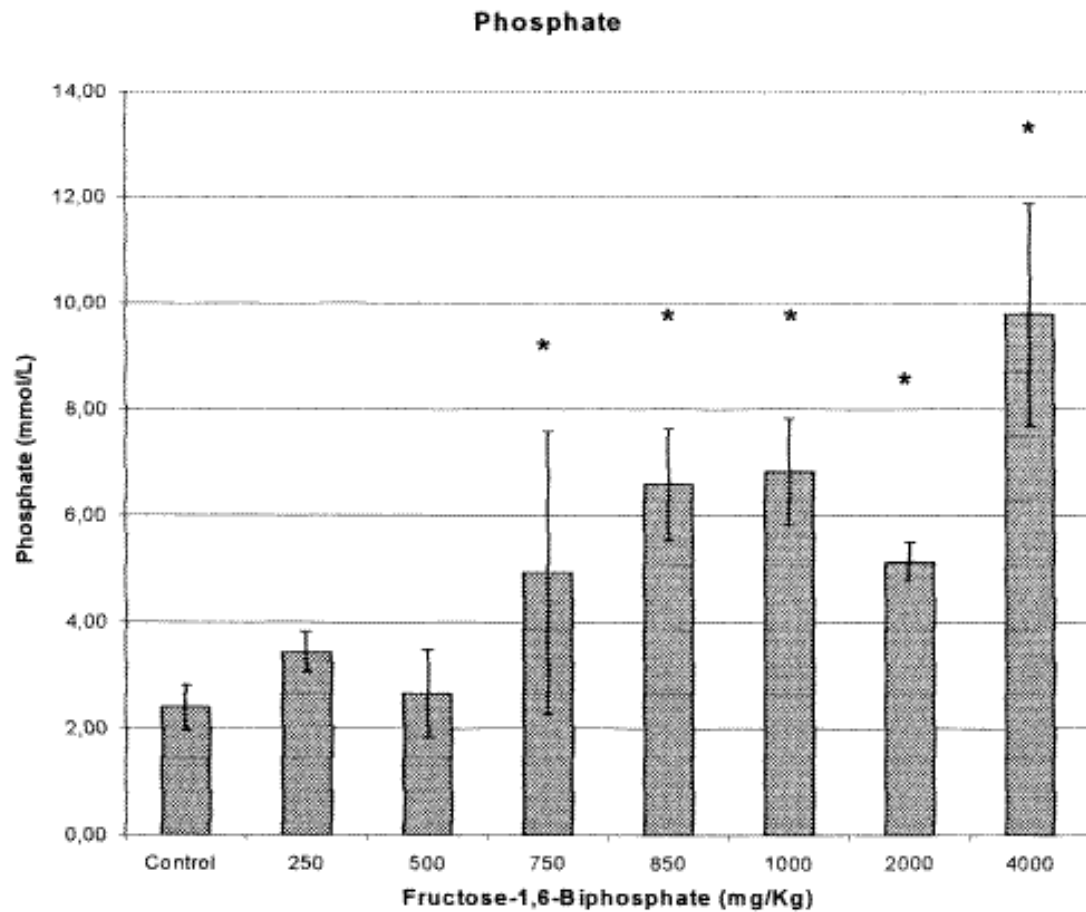


Fig. 5. Phosphate concentration in the different groups that received FBP. Significant statistical differences ($P < 0.05$) between the groups that received FBP and the control group are represented by *.

observed in Table 1 and Fig. 6. The lethal effects may result from the significant elevation of the serum phosphate caused by the partial hydrolysis of the phosphate molecules of the FBP. The administration of phosphate resulted in a very similar profile (ECG) to that of EDTA, because, as is known, high concentrations of this ion diminish the levels of ionic calcium (Vexler et al., 1999), although these two electrocardiographic profiles are different from those found in rats that received FBP. This shows that the death provoked by the bisphosphorilated sugar is not a result of the fall in the levels of ionic calcium, which confirms the findings shown in Figs. 3 and 4, where we can see that rats with the same levels ionic calcium, exhibited different outcomes, some died, while others did not.

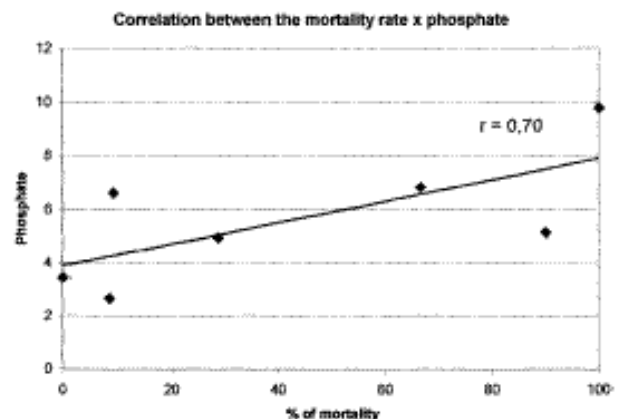


Fig. 6. Index of correlation between the mortality rate and the plasmatic phosphate. This indicated a very large correlation ($r = 0.70$).

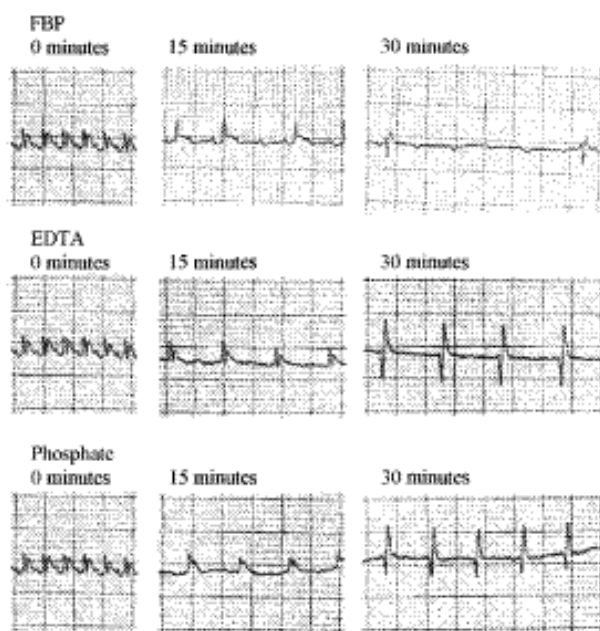


Fig. 7. ECG of the rats treated with FBP, EDTA and phosphate.

It was not possible to verify the mechanism by which FBP provoked cardiac arrest. It has been reported that this bisphosphorilated sugar blocks the K^+ channels in hepatic (Roig et al., 1997) and pancreatic (Giacosa et al., 1987) cells. However, there was no evidence that cardiac K^+ channels suffered the same effect. Therefore, we cannot suggest that this mechanism caused the cardiac arrest, although we believe that the cardiac arrest provoked by FBP may be due to a direct action of the bisphosphorilated sugar on the cardiac cell membrane.

References

- Bellet, S., Jedlicka, J., 1969. Sinoventricular conduction. *Am. J. Cardiol.* 24, 831.
- Cattani, L., Costrini, R., Cerilli, C., 1980. Fructose-1,6-diphosphate dependence on the toxicity and uptake of potassium ions. *Agressologie* 21, 263.
- Cattani, L., Costrini, R., Lazzarino, G., Diana, M., Galzigna, L., 1984. Fructose-1,6-diphosphate counteracts potassium effects on cardiac muscle. *Pharmacol. Res. Commun.* 16, 785–793.
- Chu, S.J., Chang, D.M., Wang, D., Chen, Y.H., Hsu, C.W., Hsu, K., 2002. Fructose-1,6-diphosphate attenuates acute lung injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Crit. Care Med.* 30 (7), 1605–1609.
- De Oliveira, J.R., Rosa, J.L., Ambrosio, S., et al., 1992. Effect of galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism; protective role of fructose-1,6-bisphosphate. *Hepatology* 15 (6), 1147–1153.
- Didlake, R., Kirchner, K.A., Lewin, J., Bower, I.D., Markov, A.K., 1985. Protection from ischemic renal injury by fructose-1,6-diphosphate infusion in the rat. *Circ. Shock* 16 (2), 205–212.
- Eddy, L.J., Chambers, D., Honig, S., et al., 1981. Lack of a direct metabolic effect of fructose-1,6-diphosphate in ischemia myocardium. *Am. J. Physiol.* 24, H576–H582.
- Farias, I.A., Smith, E.E., Markov, A.K., 1990. Prevention of ischemic-hypoxic brain injury and death in rabbits with fructose-1,6-diphosphate. *Stroke* 21 (4), 606–613.
- Fisher, R.A., 1971. *Tabelas Estatísticas para Pesquisa em Biologia, Medicina e Agricultura*. São Paulo e Editora Polígono.
- Galzigna, L., Rigobello, M., 1986. Proton and potassium fluxes in rat red blood cells incubated with sugar phosphates. *Experientia* 42, 138–139.
- Giacosa, A., Sukkar, G.S., Chiti, D., Marchetti, M., 1987. Effects of fructose-1,6-diphosphate on the hyperglycemic response to intravenous glucose load. *Current Therapeutic Research* 41, 874–881.
- Gregory, G.A., Yu, A.C.H., Chan, P.H., 1989. Fructose-1,6-bisphosphate protects astrocytes from hypoxic damage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9, 29–34.
- Hardin, C.D., Roberts, T.M., 1994. Metabolism of exogenously applied fructose-1,6-bisphosphate in hypoxic vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 267, H2325–H2332.
- Hassinen, I.E., Nuutinen, E.M., Ito, K., Nioka, S., Lazzarino, G., Giardina, B., Chance, B., 1981. Mechanism of the effect of exogenous fructose-1,6-bisphosphate on myocardial energy metabolism. *Circulation* 83, 584–593.
- Kirtley, M.E., McKay, M., 1977. Fructose-1,6-diphosphate, a regulator of metabolism. *Mol. Cell Biochem.* 18, 141.
- Lazzarino, G., Cattani, L., Costrini, R., Mulieri, L., Candiani, A., Galzigna, L., 1984. Increase of intraerythrocytic fructose-1,6-diphosphate after incubation of whole human blood with fructose-1,6-diphosphate. *Clin. Biochem.* 17, 42–45.
- Lazzarino, G., Nuutinen, M.E., Tavazzi, B., Cerroni, L., DiPiero, D., Giardina, B., 1991. Preserving effect of fructose-1,6-bisphosphate on high-energy phosphate compounds during anoxia and reperfusion in isolated Langendorff-perfused rat hearts. *J. Mol. Cell Cardiol.* 23, 13.
- Markov, A.K., Brumley, M.A., Figueroa, A., Skeleton, T.H., Lehan, P.H., 1997. Hemodynamic effects of fructose-1,6-diphosphate in patients with normal and impaired left ventricular function. *Am. Heart J.* 133 (5), 541–549.
- Markov, A.K., Neely, W.A., Didlake, R.H., Terry, H., Causey, A., Lehan, P.H., 2000. Metabolic response to fructose-1,6-diphosphate in healthy subjects. *Metabolism* 49 (6), 698–703.

- Nakai, T., Tanimura, H., Tabuse, K., Nagai, Y., Mori, K., Yamoto, K., 1991. Beneficial effects of fructose-1,6-diphosphate infusion on liver regeneration after ischemic liver injury. *Gastroenterol. Jpn.* 26 (5), 611–618.
- Nunes, F.B., Pires, M.G.S., Alves Filho, J.C.A., Wachter, P.H., De Oliveira, J.R., 2002. Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose-1,6-bisphosphate as cellular protection. *Crit. Care Med.* 30 (9), 2069–2074.
- Roig, T., Rattrons, R., Bermúdez, J., 1997. Exogenous fructose-1,6-bisphosphate reduces K^+ permeability in isolated rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 273, C473–C478.
- Shargel, L., Yu, A.B.C., 1999. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*, fourth ed. McGraw-Hill, New York.
- Squadrito, F., Stunolo, R., Atlavilla, D., Campo, G.M., Trimarchi, G.R., Scuri, R., Caputi, A.P., 1989. Effects of fructose-1,6-diphosphate on splanchnic artery occlusion shock in the rat. *Resuscitation* 18 (2–3), 299–307.
- Sun, J., Farias, L.A., Markov, A.K., 1990. Fructose-1,6-diphosphate prevents intestinal ischemic reperfusion injury and death in rats. *Gastroenterology* 98 (1), 117–126.
- Surawicz, B., MacDonald, M.G., Kaljot, V., Bettinger, J.C., 1959. Treatment of cardiac arrhythmias with salts of ethylenediamine-tetra-acetic acid (EDTA). *Am. Heart J.* 58, 493.
- Tallarida, R.J., Murray, R.B., 1987. *Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs*, second ed. Springer, New York.
- Vexler, Z., Margarita, B., Ursell, P.C., Sola, A., Ferrero, D.M., Gregory, G.A., 1999. Toxicity of fructose-1,6-bisphosphate in developing normoxic rats. *J. Pharmacol. Toxicol.* 84, 115–121.

