

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC**

**UNIDADE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS**

**LUANA CUCKER ALVES**

**INVESTIGAÇÃO DA NEOPTERINA E BH4 COMO BIOMARCADOR  
PREDITIVO DE GRAVIDADE EM MODELO ANIMAL DE SEPSE**

**CRICIÚMA  
2022**

**LUANA CUCKER ALVES**

**INVESTIGAÇÃO DA NEOPTERINA E BH4 COMO BIOMARCADOR  
PREDITIVO DE GRAVIDADE EM MODELO ANIMAL DE SEPSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

**Orientador: Dr. Felipe Dal Pizzol**

**Co-orientadora: Dra. Monique Michels**

**CRICIÚMA  
2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

A474i Alves, Luana Cucker.

Investigação da neopterina e BH4 como biomarcador preditivo de gravidade em modelo animal de sepse / Luana Cucker Alves. - 2022. 49 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2022.

Orientação: Felipe Dal Pizzol.

Coorientação: Monique Michels.

1. Septicemia. 2. Biomarcadores. 3. Neopterina. 4. Tetrahibrobiopterina (BH4). 5. Fenilcetonúrias.

CDD 23. ed. 616.944

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101  
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

## **FOLHA INFORMATIVA**

A dissertação foi elaborada seguindo a resolução 07/2015 do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

## RESUMO

A sepse é definida como uma resposta inflamatória sistêmica que ocorre devido a uma disfunção do sistema imune na tentativa de controlar uma infecção local. Em subconjunto com a sepse tem-se o choque séptico, disfunção orgânica que apresenta anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas. Devido à fisiopatologia complexa da sepse, ainda não foi possível encontrar um biomarcador bem definido para prever a gravidade da doença. Entretanto a neopterina tem se mostrado promissora para esta busca. A neopterina (NP) é um subproduto da via de síntese *de novo* da 5,6,7,8- tetrahidrobiopterina (BH4) e é produzida principalmente por células do sistema imune, como monócitos e macrófagos, ativados pela Guanosina Trifosfato (GTP), tendo como fator estimulante mais importante, as citocinas inflamatórias. Sendo assim, concentrações aumentadas de neopterina são observadas em doenças onde há atividade intensa de monócitos e macrófagos. O aumento das concentrações de neopterina nos fluidos biológicos está associado positivamente com patologias ligadas a processos inflamatórios e, por esta razão, atualmente é considerada um marcador sensível da ativação do sistema imune. O presente estudo tem como objetivo avaliar a capacidade da NP e BH4 como biomarcadores na predição da gravidade da sepse em modelo animal. Foram utilizados três grupos de animais: Sham, CLP (ligação e perfuração cecal), CLP+inibidor (QM385). Foram quantificados os níveis de citocinas inflamatórias (INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6) e NP e BH4 pelo método de ELISA em soro, subdividindo os grupos de animais em tempos de 24h, 48h e 72 horas após indução da sepse. Os resultados mostraram no grupo SHAM uma sobrevivência de 100%, enquanto o grupo CLP apresentou uma sobrevivência de 60%. Nos níveis séricos de NP o grupo CLP quando comparado ao grupo SHAM apresentou aumentos significativos nos tempos 24,48,72 horas. Na determinação dos níveis de BH4, houve aumento no grupo CLP no tempo de 72 horas quando comparado ao grupo SHAM. Entretanto, no grupo CLP+inibidor houve diminuição quando comparado ao grupo CLP. Com relação as citocinas inflamatórias os tempos de 24 horas e 72 horas demonstraram aumentos significativos quando comparados os grupos CLP ao grupo SHAM, e CLP+ inibidor ao grupo CLP. Sendo assim, correlacionando os níveis de citocinas inflamatórias com os níveis de NP e BH4 os tempos de 24 horas e 72 horas podem auxiliar no prognóstico da sepse. Sugere-se então que a NP pode ser um bom parâmetro para investigação da sepse.

**PALAVRAS-CHAVE:** Sepse, Biomarcador, Neopterina, BH4.

## ABSTRACT

Sepsis is defined as a systemic response that happens due to a dysfunction of the immune system in an attempt to control a local infection. In subset with sepsis, there is septic shock, organ dysfunction, which presents cellular and metabolic circulatory abnormalities. Due to the complex pathophysiology of sepsis, it has not yet been possible to find a well-defined biomarker to predict the severity of the disease. However, neopterin is promising for this search. Neopterin is a byproduct of the de novo synthesis pathway of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH4) and is produced mainly by cells of the immune system, such as macrophages, having monocytes as a system and activated by guanosine triphosphate (GTP), the most important stimulating factor, such as inflammatory cytokines. Thus, increased NP activities are observed in diseases where there are intense monocytes. The process of increasing neogenesis changes in biological fluids related to biological-related pathologies and because of this, a sensitive marker of the immune system is considered. The main objective of the present study is to evaluate the capacity of neopterin and BH4 as biomarkers in predicting the severity of sepsis in an animal model. Three groups of animals were used: Sham, CLP (cecal ligation and puncture), CLP+inhibitor (QM385). The levels of inflammatory cytokines (INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6) and NP and BH4 were quantified by the serum ELISA method, subdividing the groups of animals into 24h, 48h and 72h after sepsis induction. The results of a 100% survival in the SHAM group, while the CLP group showed a 60% survival. In the serum levels of NP the CLP group when compared to the SHAM group, it presented significant differences in the 24h, 48h, 72h time-frame. For the determination of BH4 levels, there was an increase in the CLP group within 72 hours when compared to the SHAM group. However, there was a decrease in the CLP+inhibitor group when compared to the CLP group. Regarding the inflammatory cytokines, the 24-hour and 72-hour times showed significant increases when comparing the CLP groups to the SHAM group, and CLP+ inhibitor to the CLP group. Thus, correlating the levels of inflammatory cytokines with the levels of NP and BH4 the times of 24 hours and 72 hours can help in the prognosis of sepsis. It is therefore suggested that PN may be a good parameter for investigation of sepsis.

**Keywords:** Sepsis, biomarker, Neopterin, BH4.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Score SOFA (traduzido).....	13
Figura 2 (adaptada): Fisiopatologia da sepse. ....	15
Figura 3 (Adaptada): Síntese de neopterinina através da via <i>de novo</i> .....	18
Figura 4: Esquema do modelo CLP. ....	24
Figura 5: Linha do tempo do experimento. ....	24
Figura 6: Curva de sobrevivência dos grupos SHAM, CLP e CLP+inibidor.....	26
Figura 7: Níveis séricos de NP no tempo de 24h, 48h, e 72h. ....	27
Figura 8: Níveis de BH4 nos tempos de 24h, 48h e 72h. ....	27
Figura 9: Citocina IL-1 $\beta$ nos tempos de 24h, 48h e 72h.....	28
Figura 10: Níveis séricos de IL-6 nos tempos de 24h, 48h e 72h.....	28
Figura 11: Níveis séricos de INF- $\gamma$ nos tempos de 24h, 48h e 72h.....	29
Figura 12: Níveis séricos de IL-10 nos tempos de 24h, 48h e 72h.....	29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de referência de neopterinina na urina.....	20
Tabela 2: Valores de referência de neopterinina no soro.....	21
Tabela 3: Valores de referência de neopterinina no líquido. ....	21



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT: Serotonina;

ANOVA: Análise de Variância;

BH4: 5,6,7,8- tetrahidrobiopterina

CEUA: Comissão de Ética de Uso em Animais;

CLP: Ligação e Perfuração Cecal (do inglês: *cecal ligation and puncture*);

COVID-19: Doença Corona Vírus (Corona Vírus Disease – 19)

DA: Dopamina;

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática;

GCS: Glasglow Coma Scale;

GTP: Guanosina Trifosfato

GTPCH: Gene Gch1;

IC50: Concentração Inibitória Média;

IFN-  $\gamma$ : Interferon- $\gamma$ ;

IL-1 $\beta$ : Interleucina -1 $\beta$ ;

IL-6: Interleucina 6;

ILAS: Instituto Latino Americano de Sepse;

LBP: Proteína De Ligação A Lipopolissacarídeo;

LPS: Lipopolissacarídeos;

NOS: Óxido nítrico sintase;

NP: Neopterin;

ON: Óxido nítrico;

PAMPs: Padrões Moleculares Associados aos Patógenos;

PAS: Pressão Arterial Sistólica;

PBS: Tampão Fosfato Salina (phosphate buffered saline);

PCR: Proteína C reativa;

PCT: Procalcitonina;

PTPS: 6-piruvoyl tetra-hidropterina sintase

RRP: Receptores de Reconhecimento de Padrão;

SOFA: Avaliação Sequencial de Falhas de Órgãos (do inglês: *Sequential Organ Failure Assessment*);

SR: Sepiapterina redutase;

TLR: Receptores Toll-Like;

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$ ;

UTI: Unidade de Terapia Intensiva.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1 DEFINIÇÕES E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	12
1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE .....	14
1.3 BIOMARCADORES .....	16
1.4 NEOPTERINA e BH4.....	17
<b>1.4.1 Valores normais e Importância Clínica</b> .....	<b>20</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 ANIMAIS .....	23
3.2 MODELO ANIMAL DE SEPSE .....	23
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL I.....	24
3.4 NÍVEIS DE NEOPTERINA E BH4.....	24
3.5 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA.....	25
3.6 NÍVEIS DE CITOCINAS .....	25
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
3.8 INIBIDOR QM385.....	25
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
4.1 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA.....	26
4.2 DETERMINAÇÃO DE NÍVEIS SÉRICOS DE NEOPTERINA .....	26
4.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE BH4 .....	27
4.4 CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	27
<b>4.4.1 Citocina IL1<math>\beta</math></b> .....	<b>28</b>
<b>4.4.2 Citocina IL-6</b> .....	<b>28</b>
<b>4.4.3 Citocina INF- <math>\gamma</math></b> .....	<b>29</b>
<b>4.4.4 Citocina IL-10</b> .....	<b>29</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>36</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 DEFINIÇÕES E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

De acordo com as últimas definições, a sepse é definida como uma resposta inflamatória sistêmica que ocorre devido a uma disfunção orgânica com perigo a vida causada por uma resposta desregulada à infecção (Singer et al, 2016). Caracteriza-se também pela produção excessiva de mediadores inflamatórios e pela excessiva ativação de células inflamatórias, como macrófagos e monócitos, resultando em uma tempestade inflamatória e comprometendo diversos órgãos (Angus et al., 2001; Dellinger 2003; Dellinger et al., 2012). Nessa nova definição, alguns termos como septicemia, síndrome séptica e sepse grave foram colocados em desuso. Em subconjunto com à sepse tem-se o choque séptico, que é tido como sepse acompanhado de disfunção orgânica que apresenta anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas, associadas com maior risco de morte do que a sepse isoladamente (Singer et al., 2016; Shankar-Hari et al., 2016).

Os critérios clínicos para a sepse seguem a utilização de pontos no *Sequential Organ Failure Assessment Score* (SOFA) (Figura 1), onde a suspeita ou certeza de infecção e um aumento agudo de  $\geq 2$  pontos no *score* em resposta a uma infecção, representando disfunção orgânica, caracterizam a sepse. Já os pacientes com choque séptico podem ser identificados por sepse com hipotensão persistente exigindo vasopressores para manter a pressão arterial em 65 mmHg e com nível sérico de lactato  $>2$  mmol/L (18 mg/dL) após uma reanimação volêmica adequada (Singer et al., 2016; Seymour et al., 2016; Shankar-Hari et al., 2016; Abraham et al., 2016).

Sendo assim, segundo Singer et al (2016) na suspeita de um paciente com infecção fora da Unidade de Tratamento Intensivo (UTI), sugere-se a utilização das variáveis do *quick SOFA* (qSOFA) score Glasgow Coma Scale ((GCS)  $< 15$ , FR  $\geq 22$  e Pressão Arterial Sistólica (PAS)  $\leq 100$ ). No caso do preenchimento de 2 ou mais critérios, o diagnóstico continua baseado nos critérios do esquema, como mostra a Figura 1. A utilização de exames laboratoriais auxilia no cálculo do SOFA score. Um aumento de 2 ou mais pontos no Score, indica a confirmação de sepse. Posterior a isso, se o paciente precisar do uso de vasopressor para que a média da pressão

arterial permaneça maior que 65 mmHg e o nível de lactato sérico for > 2 mmol/L, ele corresponde ao diagnóstico de choque séptico.

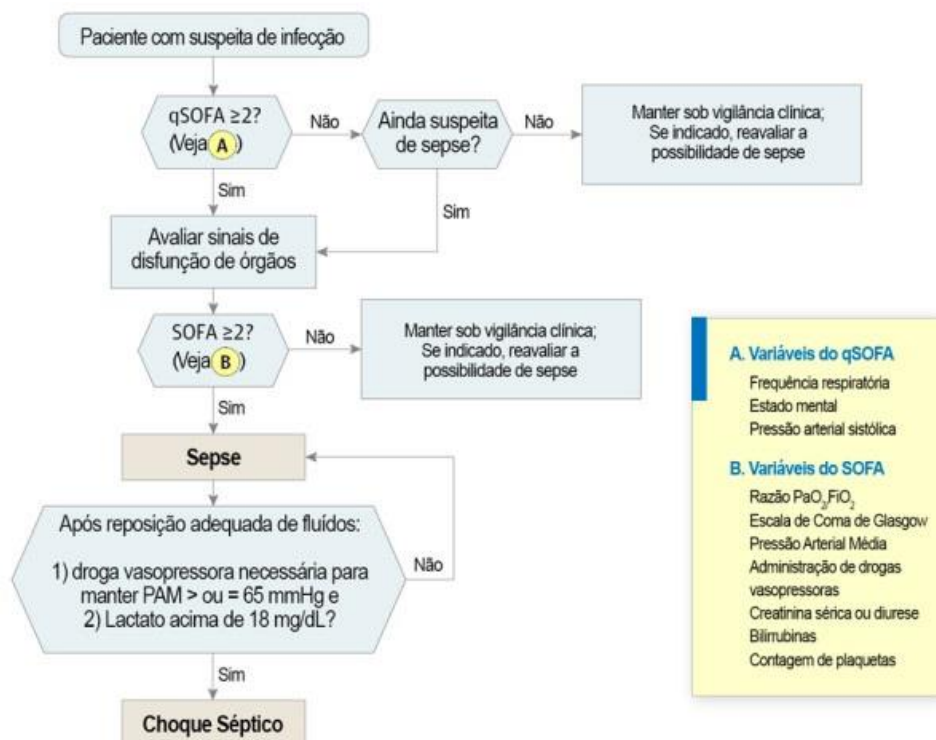


Figura 1: Score SOFA (traduzido). Instrumento de critérios clínicos para identificação de pacientes com sepse e choque séptico. Fonte: Singer et al., 2016.

Sendo vistos como um dos maiores problemas de saúde, afetando milhões de pessoas no mundo todo, a sepse e o choque séptico aumentam a incidência mundial de morte a cada ano, levando ao óbito uma em quatro pessoas (ou mais). Além disso, é considerada uma das principais causas de mortalidade no mundo, e um dos principais motivos de internação em UTIs (Neira et al., 2018; Bracht et al., 2019). Um estudo de Angus e Poll (2013) mostra que a estimativa global de casos de sepse é de 19,4 milhões de casos, e 5,3 milhões de mortes ao ano, sendo que pacientes que sobrevivem a sepse apresentam problemas cognitivos e motores a longo prazo, transtornos de humor, e baixa qualidade de vida.

Embora os dados no Brasil sejam um pouco escassos, o maior banco de dados disponível é o Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS), instituição envolvida no treinamento de hospitais no processo de implementação de protocolos gerenciados de sepse (Micek et al., 2006). Segundo o ILAS em 2015, a mortalidade em hospitais privados causada pela sepse no Brasil foi de 34,5% e em hospitais públicos de 57,6%.

Já um estudo conduzido por Neira et al. (2018), mostrou que de 2006 a 2015 a incidência de sepse aumentou 50,5%, de 31,5/100.000 para 47,4/100.000 casos por ano. Já a mortalidade aumentou 85%, passando de 13,3/100.000 para 24,6/100.000 casos por ano. A taxa para hospitalizações internações na UTI, foi de 64,5%. Essas análises só ressaltam que a incidência e prevalência de sepse no Brasil são altas, que a mortalidade está entre as mais elevadas do mundo, e que o resultado irá depender do acesso aos recursos oferecidos e a disponibilidade de tratamentos adequados (Machado et al., 2017).

Há também outro dado importante: os profissionais de saúde e os custos econômicos associados à sepse são altos. Existem diversos estudos abordando custo em diferentes países (Grozdanovski et al., 2012; Chalupka e Talmor, 2012). Nos Estados Unidos, os custos são avaliados para um caso de sepse é de aproximadamente 38.000 dólares. Já na Europa, varia entre 26.000 a 32.000 dólares. A importância desses números mostra que entre 20% a 40% do custo total das UTIs é resultado em cuidados com pacientes com sepse (Silva et al., 2004; Taniguchi et al., 2014). Esses gastos têm uma relação importante com gravidade e tempo de internação.

E no Brasil, o estudo COSTS conduzido pelo ILAS, avaliando pacientes sépticos internados nas UTIs de hospitais públicos e privados, mostrou dados similares (Conde et al., 2013). A média do custo total do tratamento de sepse foi avaliado em 9.632 dólares por paciente, enquanto o custo diário por paciente foi de 934 dólares. Outro dado importante é que o valor médio do custo diário da UTI por paciente foi significativamente maior em não sobreviventes do que em sobreviventes, ou seja, 1.094 dólares e 826 dólares, validando a ideia entre a gravidade e os custos.

## 1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

A complexidade entre a comunicação do hospedeiro e microrganismo está relacionada à fisiopatologia da sepse. Os mecanismos de reconhecimento específicos e componentes da resposta inata têm sido caracterizados como uma via de controle da imunidade adquirida, mecanismos de reconhecimento específicos, e componentes da resposta inata. Tais mecanismos são formados por receptores da membrana celular que são ativados com o reconhecimento do microrganismo mediante aos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), que estão expressos na superfície dos patógenos (Cinel e Dellinger, 2007).

Portanto, a fisiopatologia da sepse iniciará com a invasão de um agente. Por conta da lise da parede celular, durante a replicação da bactéria como consequência da sua morte, são liberados lipopolissacarídeos (LPS) e as exotoxinas. Diversos receptores são capazes de reconhecer essas moléculas e ativar a resposta imune inata (Triantafilou e Triantafilou, 2002). Deste modo, o reconhecimento desses PAMPs é realizado por receptores localizados nas células do sistema imune inato, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Tais receptores são chamados de receptores de reconhecimento de padrões (PPR – *Pattern recognition receptors*). Um dos membros mais importantes dos PPRs são os receptores *Toll-like* (TLR). Esses receptores pertencem a uma família de receptores transmembrana do tipo 1, que se caracterizam por comandos extracelulares repetitivos ricos em leucina e um comando citoplasmático homólogo ao receptor de interleucina-1 (IL-1) (Figura 2) (Weighardt e Holzmann, 2008).

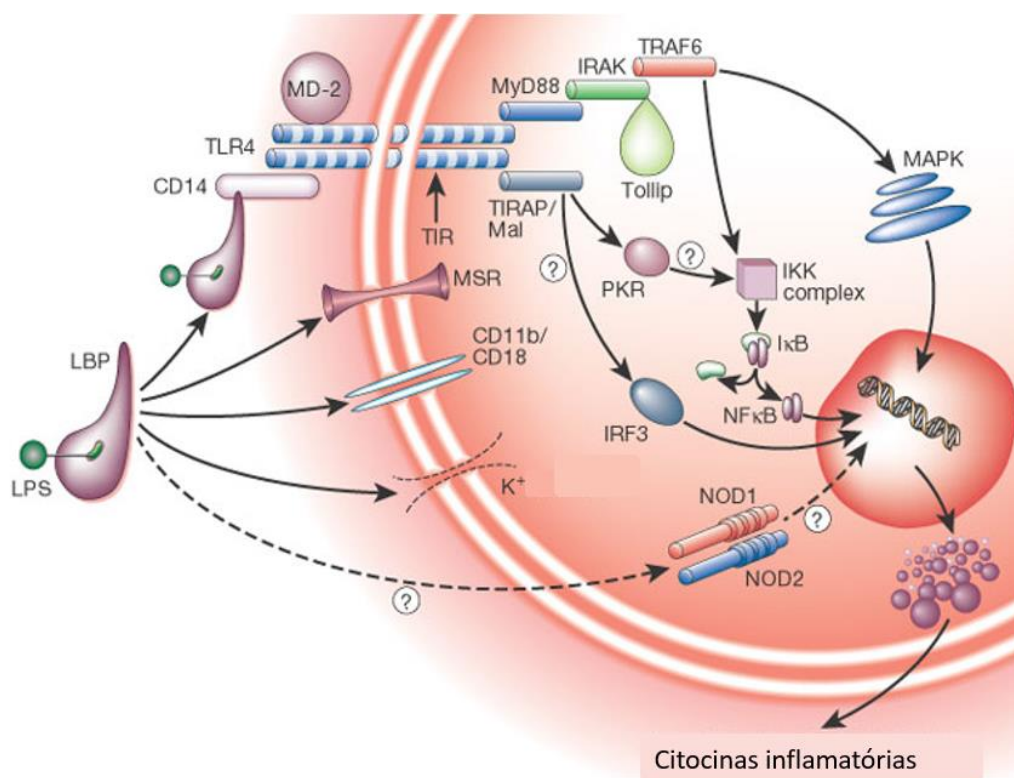


Figura 2 (adaptada): Fisiopatologia da sepse. Após o reconhecimento do agente patológico pelo receptor TLR4, vias de transdução são ativadas levando a translocação do NFκB para o núcleo. Com isso ocorre a expressão de mediadores inflamatórios, que irão favorecer uma intensa resposta inflamatória, levando a uma resposta inflamatória sistêmica. Fonte: Cohen J; 2022 – adaptada.

A ativação da resposta imune inata ocorre após a interação entre PAMPs-PPRs, com o objetivo de sistematizar uma resposta defensiva em conjunto com

componentes humorais e celulares. Com isso, as células residentes tem como função liberar uma grande diversidade de moléculas sinalizadoras como prostaglandinas, leucotrienos, citocinas e quimiocinas, que estimulam a resposta inflamatória, chegando ao seu objetivo principal que é recrutar e ativar os leucócitos para o local da infecção, reproduzindo um dos papéis mais importantes da imunidade inata (Janeway, 2001a; Janeway 2002b). Todavia, uma resposta intensa do organismo com produção de vários mediadores inflamatórios e consequentes alterações fisiológicas (Annane et al., 2003a; Annane et al 2005b), pode ser desencadeado devido à interação de diversos componentes infecciosos, imunológicos, endócrinos, hemodinâmicos, cardiovasculares e até mesmo genéticos (De Maio, 2005; Remick, 2007).

### 1.3 BIOMARCADORES

Um biomarcador, ou marcador biológico pode ser definido como uma característica que é medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos, ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Na clínica, definir um biomarcador é extremamente útil, pois pode auxiliar na tomada de decisões. Um biomarcador ideal possui alta sensibilidade, cinética rápida, e especificidade (Cohen et al., 2015).

Resumidamente, os biomarcadores podem ser divididos em dois tipos: marcadores de diagnóstico e prognóstico. Um biomarcador de diagnóstico pode, por exemplo, diminuir o uso inadequado de antibióticos ou auxiliar na administração do mesmo, pois ajuda a discriminar a sepse de doença crítica não infecciosa, e também diferenciar organismos causadores de sepse (Bochud 2001; Bochud 2004). Já os biomarcadores de prognósticos podem ajudar a prever resultados em pacientes com sepse, atribuindo perfis de risco. Além de abrir um caminho para identificar vias fisiopatológicas que possam ser alvo de terapia personalizada (Sims et al., 2016).

Existem alguns possíveis biomarcadores de sepse citados na literatura como, por exemplo, a neopterin (NP), a procalcitonina (PCT), proteína C reativa (PCR), proteína de ligação a lipopolissacarídeo (LBP), e também a interleucina-6 (IL6) (Reinhart e Meisner, 2011). Embora a PCT esteja sendo mostrada na literatura como



diferencial entre os outros citados, o seu uso ainda é muito limitado para produzir um benefício clínico substancial, devido a sua baixa sensibilidade e especificidade, podendo ter os seus níveis também aumentados em várias outras condições associadas a uma resposta inflamatória (Ruononen et al, 2002; Tang et al., 2007; Van Engelen et al, 2018).

#### 1.4 NEOPTERINA e BH4

A *d-eritro*-neopterina (neopterina) é uma substância de baixa massa molecular, sendo um subproduto da via da síntese *de novo* da 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4) e é produzida principalmente por células do sistema imune, como monócitos e macrófagos, tendo como fator estimulante mais importante as citocinas inflamatórias, como interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) (Hamerlinck, 1999; Franscini et al., 2003).

Esses estímulos induzem a ativação da primeira enzima limitante da taxa de BH4 na via *de novo*, guanossina trifosfato ciclo-hidrolase. Com base nessa regulação transcricional do gene *Gch1* (GTPCH), seu substrato guanossina trifosfato (GTP) é convertido em trifosfato de 7,8-di-hidroneopterina. Então, 6-piruvoyl tetra-hidropterina sintase (PTPS) retira os fosfatos para gerar 6-piruvoyl-tetra-hidropterina, que é posteriormente convertida em BH4 por sepiapterina redutase (SR) (Werner et al, 1990). Sob condições inflamatórias, a atividade da GTPCH é aumentada, enquanto PTPS e SR são ligeiramente aumentados. Conseqüentemente, o PTPS se torna a enzima limitadora, favorecendo formação de neopterina (Figura 3) (Martins et al., 2018; Ghisoni et al., 2015).

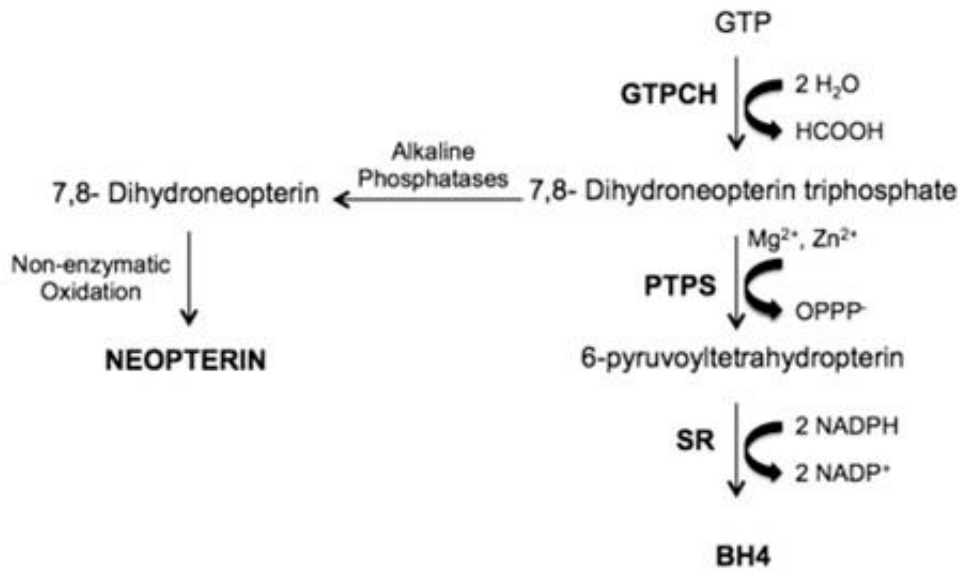


Figura 3 (Adaptada): Síntese de neopterin através da via *de novo* da tetrahydrobiopterina (BH4). Guanosina trifosfato (GTP), GTP ciclo-hidrolase I (GTPCH), 6-piruvil-tetra-hidropterina sintase (PTPS), e sepiapterina redutase (SR) (Adaptado de Ghisoni et al., 2015).

Assim como a neopterin, a BH4 pertence a um grupo de compostos conhecidos como pteridinas. As pteridinas são uma classe de compostos heterocíclicos naturais amplamente distribuídas pelos tecidos. A BH4 atua biologicamente como cofator obrigatório para a atividade das enzimas fenilalanina hidroxilase, tirosina hidroxilase e triptofano hidroxilase, as quais catalisam as etapas iniciais da degradação da fenilalanina no fígado, assim como as etapas iniciais limitantes da biossíntese dos neurotransmissores da dopamina (DA) e serotonina (5-HT), respectivamente. Células neurais ou células do sistema imune podem induzir a síntese de BH4, por ser um dos cofatores obrigatórios para atividade de todas as formas do óxido nítrico sintase (NOS), sendo essencial para síntese de óxido nítrico (ON) (Werner, Werner-Felmayer e Mayer, 1998).

Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que em doenças inflamatórias estimuladas por macrófagos com células T derivadas de IFN- $\gamma$  estimulam a atividade da GTP ciclo- hidrolase I, ocasionando um aumento da concentração de NP (Muller 1991; Werner 1990; Huber 1984). Portanto, a NP é considerada um marcador bioquímico de imunidade mediada por células (Muller 1998; Murr 1998). Podendo também ser considerado um cofator relacionado a sobrevida/óbito devido a

excessiva produção do mesmo na síntese de radicais livres (Berdowska 2001; Oettl 1999).

As concentrações de NP portanto, refletem o nível de estresse oxidativo causada pela ativação do sistema imunológico (Weiss et al., 1998). Vale ressaltar que apesar da NP ter a sua fonte principal nas células do sistema imune, ela também pode ser formada nos rins. Sua liberação é feita nas vias glomerulares e também nas secreções tubulares (Oda et al., 1999; Anwaar et al., 1998). Outra via de síntese de NP são as células microgliais no Sistema Nervoso Central (SNC), que apresentam quantidades detectáveis da substância (Millner et al., 1998). Logo, a NP pode ser detectada em vários fluidos corporais, tais como por exemplo, soro (Oda et al., 1999; Kondera-Anasz et al., 1997), urina (Oda 1999, Zangerle 1994, Kronberger 1995), e fluido cérebro-espinhal (Millner et al., 1998).

Uma forma de compreender a importância de avaliar os níveis de NP e BH4 no decorrer da sepse, é utilizando o inibidor da enzima Sepiapterina Redutase (SR), o QM385. O QM385 se liga com alta afinidade a SR, diminuindo significativamente a atividade da via (Cronin et al., 2018). Considerando que o aumento de NP provoca intensa síntese de BH4, a utilização do inibidor elucidaria a relação da intensa produção do cofator com a sobrevida/óbito.

Já foi demonstrado na literatura que as concentrações intracelulares de BH4 são determinadas pela ação das vias de síntese *de novo*, de *salvação* e de *reciclagem* (Wijemanne e Jankovic, 2015). Sendo assim, nas vias *de novo* e de *salvação* o inibidor QM385 tem a capacidade de inibir a SR, que é a enzima auxiliadora final na formação de BH4, como citado anteriormente, reduzindo assim a formação da mesma, e acumulando intermediário metabólico sepiapterina (Latremoliere et al., 2015). Além disso, o QM385 se mostrou com uma meia vida mais longa, e também alta afinidade a ligação com sepiapterina redutase em ensaios, e reduziu eficientemente os níveis de BH4 (Cronin et al., 2018; Fujita et al., 2020).

Com relação ao papel fisiológico da NP, há uma relação com o estresse oxidativo. Quando estimulado com INF- $\gamma$ , macrófagos secretam, além das formas reativas de oxigênio, dois derivados de pteridina: neopterina não reduzida, e 7,8-dihidroneopterina reduzida, que desempenham um papel nas reações mediadas por

radicais livres (Berdowska 2001). Essa forma reduzida atua como sequestradora de radicais livres, mas também, por exemplo a tetrahidrobiopterina, mostra uma disposição à auto oxidação na presença de moléculas de oxigênio, levando a formação de radicais superóxido. O 7,8-dihidroneopterina é o composto mais estável, embora seja sensível ao oxigênio e pode induzir a apoptose em concentrações mais altas (Berdowska 2001; Oettl 1999). Já foi demonstrado que particularmente na presença de ferro iônico, a dihidroneopterina potencializa a formação de radicais de oxigênio (Oettl 1999).

#### 1.4.1 Valores normais e Importância Clínica

Concentrações aumentadas de neopterina são observadas em doenças onde há atividade intensa de monócitos e macrófagos. As medidas de neopterina nos fluídos corporais fornecem informações sobre o estado atual da resposta imune celular e frequentemente ajudam a prever a progressão da doença (Berdowska 2001). A liberação de neopterina inicia 3 dias antes da proliferação das células T atingirem o seu máximo, e também pode-se observar um aumento na produção de neopterina uma semana antes do aparecimento de anticorpos específicos. Portanto, o aumento das concentrações de NP nos fluídos biológicos está associado positivamente com patologias ligadas a processos inflamatórios e, por esta razão, é considerada um marcador sensível da ativação do sistema imune (Fuchs et al., 1989b; Millner et al., 1998). Valores normais dependem da idade, sexo e material biológico como: urina, soro/plasma, líquido cefalorraquidiano (Hagberg et al., 1993; Murr et al., 2002) (Tabela 1, Tabela 2, e Tabela 3).

Idade	Homens	Mulheres
19-25	123	128
26-35	101	124
36-45	109	140
46-55	105	147
56-65	119	156
>65	133	151

Tabela 1: Valores de referência para homens e mulheres saudáveis de neopterina na urina (umol/mol creatinina). Fonte: Hagberg et al., 1993.

Idade	Homens e mulheres
19-75	5,3
>75	9,7

Tabela 2: Valores de referência para homens e mulheres saudáveis de neopterinina no soro (nmol/L). Fonte: Hagberg et al., 1993.

Idade	Homens e Mulheres
19-75	4,2+1,0

Tabela 3: Valores de referência para homens e mulheres saudáveis de neopterinina no líquido cefalorraquidiano (nmol/L). Fonte: Hagberg et al., 1993.

Concentrações de NP são encontradas aumentadas em doenças infecciosas (Pascual et al., 1998), doenças malignas (Murr et al. 1998), doenças auto-imunes (Nasonov et al., 1998; Altindag et al., 1998), cardíacas e insuficiência renal (Roccatello et al., 1992; Schumacher et al., 1997), doença arterial coronariana (Weiss et al., 1994), aloenxerto rejeição (Reibnegger et al., 1991), e atualmente até mesmo em pacientes com COVID-19 (Ozger et al., 2020).

Contudo, especialmente na sepse é encontrado um aumento significativo e curiosamente específico da NP (Pascual et al., 1998). Os níveis altos de NP podem ser usados para predição da gravidade da sepse (Hamerlinck, 1999; Gomez-Jimenez et al., 1995). Strohmaier et al. (1987) observou uma correlação entre os níveis plasmáticos de NP e as taxas de mortalidade em pacientes com sepse, corroborando com a ideia de outros autores (Hamerlinck, 1999; Fuchs et al., 1992; Berdowska et al., 2001). As concentrações de NP são consideravelmente maiores em pacientes não sobreviventes do que em sobreviventes (Fuchs et al., 1992). E além disso, a NP pode ser facilmente quantificada em fluídos biológicos (Baydar et al., 2008).

Portanto devido a limitação atribuída a fisiopatologia complexa da sepse, ainda não foi possível encontrar um biomarcador que forneça informações precisas sobre os principais fatores ligados a doença (Perner 2017; Gibot 2012). A procura por ferramentas tem se tornado muito necessária (Dal Pizzol e Ritter, 2012; Brant et al., 2020), pois evitaria o atraso no diagnóstico, que geralmente resulta em rápida progressão para o colapso circulatório, falência de órgãos, e eventualmente morte (Warren, 1997; Parillo et al., 1990). Sendo assim, um diagnóstico preciso limitará a morbidade, reduzirá custos, e resultará em um melhor prognóstico dos pacientes (Pittet et al., 1995; Bochud et al., 2001).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Quantificar níveis de NP e BH4 como possíveis biomarcadores em animais submetidos à sepse.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar níveis de NP e BH4 pelo método de ELISA em soro de animais nos tempos de 24h, 48h e 72h após indução da sepse;
- Compreender a via envolvida tratando os animais com um inibidor específico (QM385) e posteriormente, quantificar níveis de NP e BH4 em animais submetidos a sepse;
- Analisar os níveis de citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, e INF- $\gamma$  em animais após indução da sepse nos tempos de 24h, 48h, 72h.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

A utilização dos animais seguiu o protocolo experimental submetido para a Comissão de Ética de Uso em Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, com número de protocolo de aprovação 58/ 2020 (Anexo A).

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos, pesando entre 200-300g, fornecidos pelo Biotério da UNESC. Os ratos foram mantidos em ciclos de claro-escuro de  $\pm 12$  horas (7:00 as 19:00h) a uma temperatura entre 18 e 22 °C, umidade relativa entre 55 e 65%. Os animais tiveram livre acesso à água e alimento, foram manipulados por pessoas qualificadas, evitando dores e estresse desnecessários. Ao final dos experimentos, os animais foram submetidos a eutanásia sob condições prescritas pelo comitê de ética.

#### 3.2 MODELO ANIMAL DE SEPSE

O modelo CLP (do inglês *cecal ligation and puncture*), consiste em ligação e perfuração do ceco (Brooks et al., 2007). Ele é o que mais se assemelha ao quadro de sepse em humanos, pois tem a capacidade de induzir danos cognitivos através da infecção causada ao perfurar o ceco dos animais. Com isso é um dos modelos mais aceitos para mimetizar a presença de sepse.

Os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e submetidos à laparotomia com incisão mediana abdominal. O ceco foi ligado abaixo da junção íleo-cecal com fio seda 3-0 e perfurado com uma agulha número 14, gentilmente comprimindo até a extrusão de conteúdo fecal. Os planos cirúrgicos foram fechados e os ratos observados por 2 horas (figura 4). Todos os grupos receberam suporte básico (salina em 50 ml/kg imediatamente e 12 horas após CLP). Todos os animais receberam antibióticos (ceftriaxona a 30 mg/kg) e dipirona (80 mg/kg) a cada 6 h subcutâneo por 3 dias. A mortalidade desse modelo é cerca de 40%.

Nos grupos sham os animais foram submetidos apenas a laparotomia e exposição do ceco, sem perfuração e extravasamento. Já os animais do grupo CLP receberam as mesmas manipulações realizadas no grupo sham, porém com perfuração e extravasamento do conteúdo fecal.

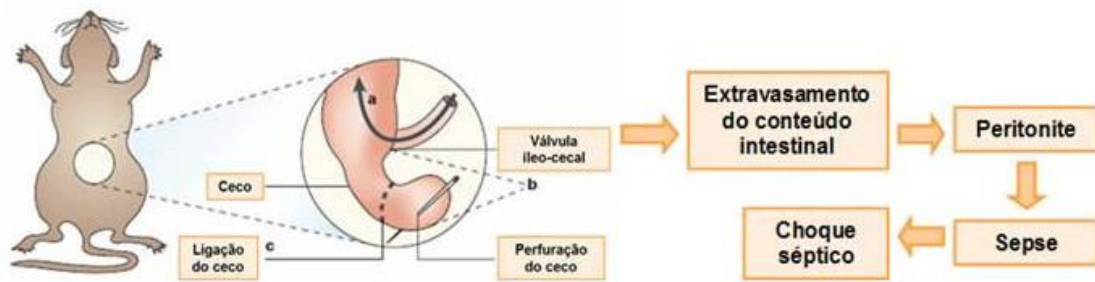


Figura 4: Esquema do modelo CLP: Laparotomia abdominal, exposição do intestino, ligação do ceco, perfuração cecal, extravasamento das fezes, levando a peritonite e sepse. Fonte: Adaptado de Buras, Holzmann e Sitkovsky, 2005.

### 3.3 DESENHO EXPERIMENTAL I

Foram utilizados 100 animais, ratos machos *Wistar* de 60 dias, e divididos em três grupos, sendo estes: Sham, CLP e CLP+inibidor (QM385). Os animais foram ainda subdivididos em grupos com um n de 10 nos tempos de 24 horas, 48 horas e 72 horas (Figura 5). Além disso, mais animais com n de 10 por grupo foram acompanhados para avaliação da sobrevivência.

O sangue foi coletado no momento da decapitação com o tubo coletor tipo *ependorf*. Os níveis de neopterin e BH4 foram analisados pelo método de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) para avaliação dos níveis de NP e BH4

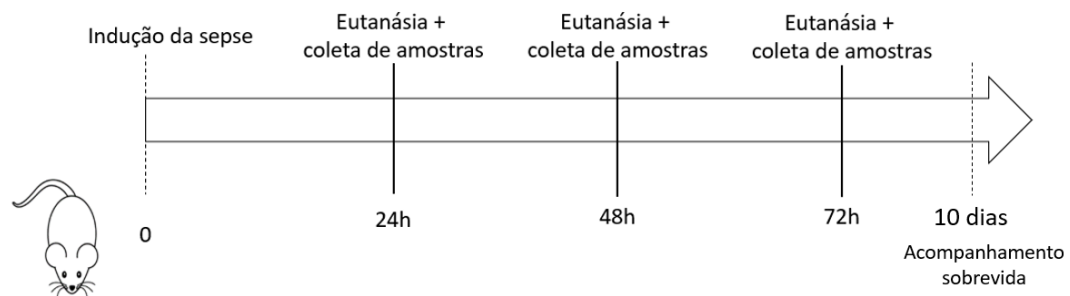


Figura 5: Linha do tempo do experimento, contendo datas da indução de sepse, coleta das amostras e morte dos animais. Elaborada pela autora, 2021.

### 3.4 NÍVEIS DE NEOPTERINA E BH4

Os níveis séricos de NP e BH4 foram analisados através do kit comercial pela técnica de ELISA, seguindo as instruções do fabricante (MyBiosource).



### 3.5 CURVA DE SOBREVIDA

Os grupos SHAM, CLP e CLP+inibidor com n de 10 animais por grupo, foram acompanhados por 10 dias consecutivos após indução da sepse para verificar taxa de sobrevida e correlacionar com os níveis de Neopterin e BH4, dos tempos de 24 horas, 48 horas, e 72 horas.

### 3.6 NÍVEIS DE CITOCINAS

Os níveis das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, e INF- $\gamma$  em soro foram determinados através do kit comercial pela técnica de ELISA (Wood et al., 2019). Amostras homogeneizadas em Tampão Fosfato Salina (PBS) foram adicionadas em placas pré incubadas com anticorpo específico para cada citocina. Anticorpo secundário foi incubado e então adicionada a streptavidina e posterior a isso a solução substrato. Depois da incubação, foi adicionada solução *stop* para parar a reação. A densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 630 nm.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram apresentadas na forma de média  $\pm$  desvio padrão e comparadas com o teste de análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Curva de sobrevida foi avaliada pelo método Kaplan-Meier e Log-rank. Todos os testes foram analisados no programa SPSS versão 21 e gráficos construídos no software *GraphPad Prism 4.0*. Em todas as análises foi adotado como nível para significância estatística um valor de  $p < 0,05$ .

### 3.8 INIBIDOR QM385

A administração do inibidor QM385 foi realizado intraperitoneal com a concentração de 10 mL/kg em todos os animais do grupo CLP+inibidor durante a indução de sepse, através do kit comercial, seguindo as instruções do fabricante (MedChem Express USA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 CURVA DE SOBREVIDA

Quando avaliado a sobrevida dos animais, a indução de sepse apresentou uma taxa de sobrevida de 60%, enquanto os animais que tiveram a inibição da produção de NP apresentaram a taxa de cerca de 70%, e os animais do grupo SHAM com 100%. Os animais do grupo CLP apresentaram uma maior taxa de mortalidade quando comparados aos animais do grupo SHAM ( $p < 0,05$ ) (Figura 6).

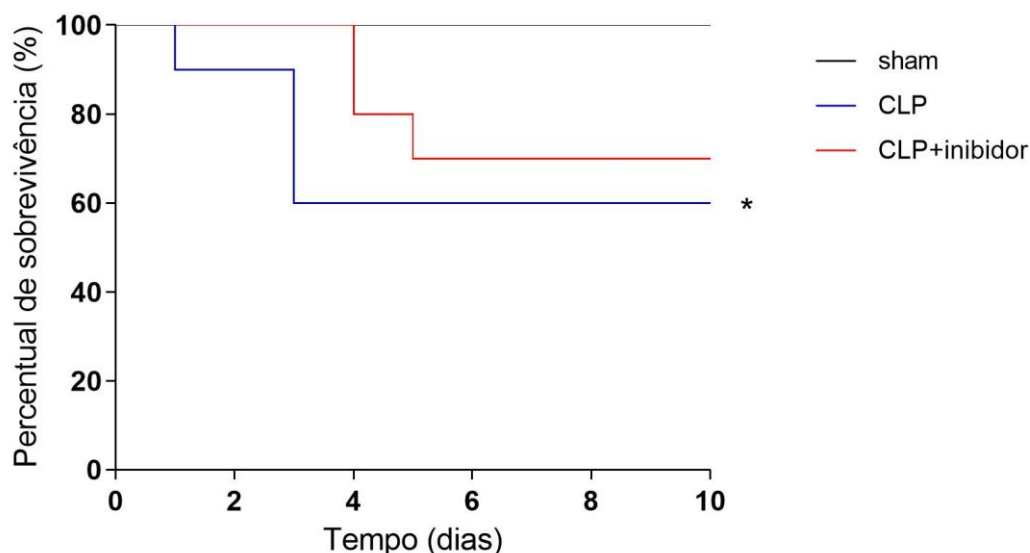


Figura 6: Curva de sobrevida dos animais dos grupos SHAM, CLP e CLP+inibidor, acompanhados durante 10 dias.  $n=10$  cada grupo. \*  $p < 0,05$  versus SHAM.

### 4.2 DETERMINAÇÃO DE NÍVEIS SÉRICOS DE NEOPTERINA

Para entender como a NP se comportaria ao decorrer do desenvolvimento da sepse, foram analisados os níveis séricos no grupos SHAM, CLP, CLP+inibidor nos tempos de 24 horas, 48 horas, e 72 horas após a indução de sepse.

Os níveis de NP se mostraram aumentados significativamente no grupo CLP em relação ao grupo SHAM, no tempo de 24 horas, 48 horas e 72 horas. Além disso, é possível observar que os níveis do grupo CLP+inibidor estão diminuídos em

grande parte dos tempos analisados, evidenciando que o inibidor QM385 foi capaz de reduzir a produção de NP (Figura 7).

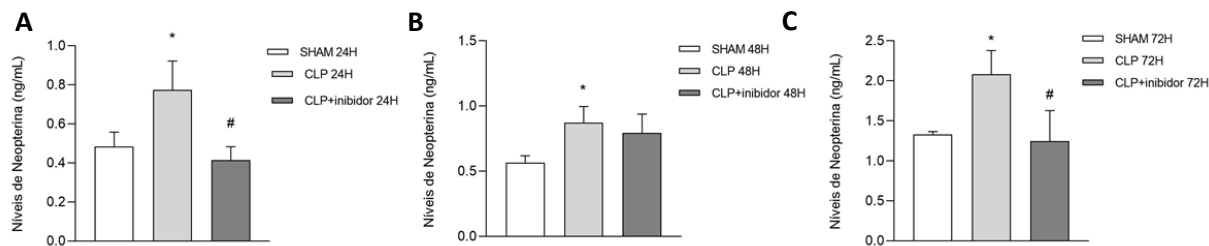


Figura 7: Níveis séricos de NP no tempo de 24 horas, 48 horas, e 72 horas após indução da sepse. 24 horas (A); 48 horas (B); 72 horas (C). Os dados são expressos como média  $\pm$  DP e comparadas com análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey.  $n=10$  cada grupo. \*  $p<0,05$  versus SHAM; #  $p<0,05$  versus CLP.

### 4.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE BH4

Para esclarecer ainda mais a liberação de NP durante o decorrer da doença, foram dosados os níveis séricos de BH4 nos animais, também em diferentes tempos. Os resultados mostram que não houve diferença estatística nos tempos de 24 horas e 48 horas. Entretanto no tempo de 72 horas os níveis de BH4 no grupo CLP estão aumentados em relação ao grupo SHAM, além de indicar a eficácia do inibidor QM385 de diminuir a síntese de BH4 (Figura 8).

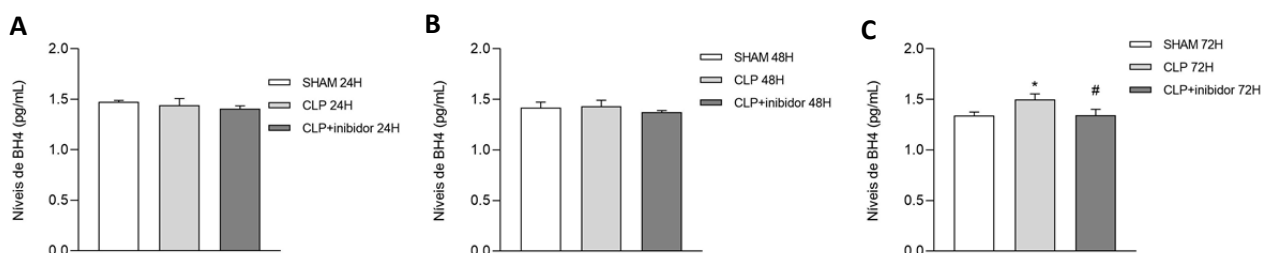


Figura 8: Níveis de BH4 nos tempos de 24 horas, 48 horas e 72 horas após indução da sepse. 24 horas (A); 48 horas (B); 72 horas (C). Os dados são expressos como média  $\pm$  DP e comparadas com análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey.  $n=10$  cada grupo. \*  $p<0,05$  versus SHAM; #  $p<0,05$  versus CLP.

### 4.4 CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Sabe-se que a inflamação está relacionada com a fisiopatologia da sepse, por isso para melhor elucidar e complementar os resultados obtidos com os diferentes

tempos de dosagens de NP e BH4 foram avaliados os níveis séricos das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10.

#### 4.4.1 Citocina IL1 $\beta$

Os níveis de IL-1 $\beta$  dos animais de 24 horas e 72 horas após a indução de sepse se demonstraram aumentados no grupo CLP em relação ao grupo SHAM, e com uma diminuição significativa do grupo CLP+inibidor em relação ao grupo CLP (Figura 9).

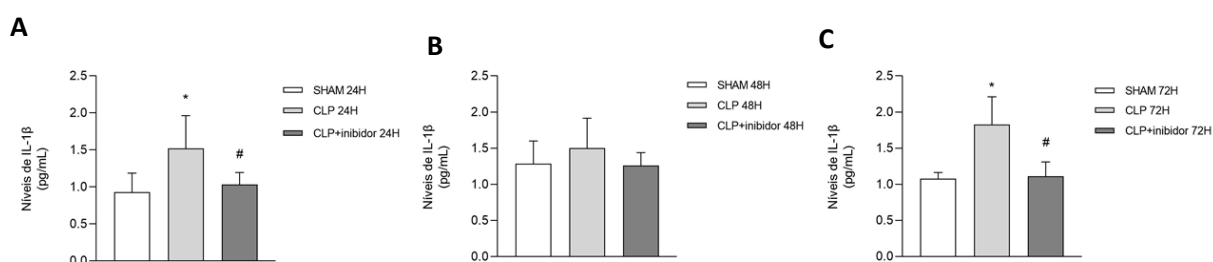


Figura 9: Citocina IL-1 $\beta$  nos tempos de 24 horas, 48 horas e 72 horas após a indução da sepse. 24 horas (A); 48 horas (B); 72 horas (C). Os dados são expressos como média  $\pm$  DP e comparadas com análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. n=10 cada grupo. \* p<0,05 versus SHAM; # p<0,05 versus CLP.

#### 4.4.2 Citocina IL-6

Os níveis séricos de IL-6 nos animais 24 horas e 72 horas após a indução da sepse estão aumentados no grupo CLP em relação ao grupo SHAM, e diminuídos no grupo CLP+inibidor em relação ao grupo CLP (Figura 10).

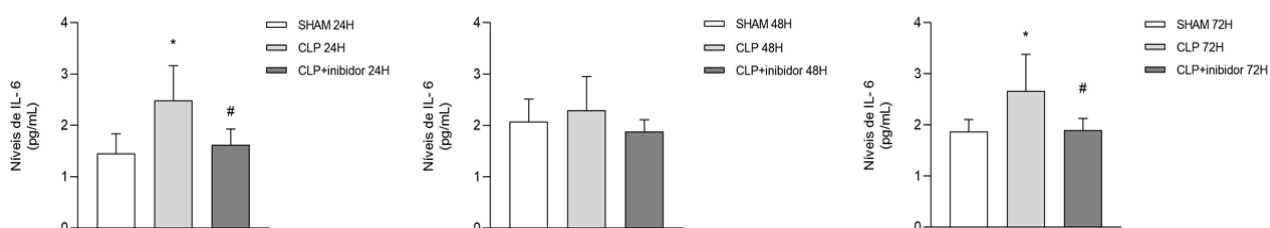


Figura 10: Níveis séricos de IL-6 nos tempos de 24 horas, 48 horas e 72 horas após indução da sepse. 24 horas (A); 48 horas (B); 72 horas (C). Os dados são expressos como média  $\pm$  DP e comparadas com análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. n=10 cada grupo. \* p<0,05 versus SHAM; # p<0,05 versus CLP.

#### 4.4.3 Citocina INF- $\gamma$

A citocina inflamatória INF-  $\gamma$  no grupo CLP se mostra aumentada em relação ao grupo SHAM no tempo de 24 horas, e diminuída no grupo CLP+inibidor em relação ao grupo CLP. Os resultados do tempo de 72 horas foram semelhantes.

No tempo de 48 horas apenas o grupo CLP+inibidor demonstrou diferença estatística, estando os níveis diminuídos quando comparado ao grupo CLP (Figura 11).

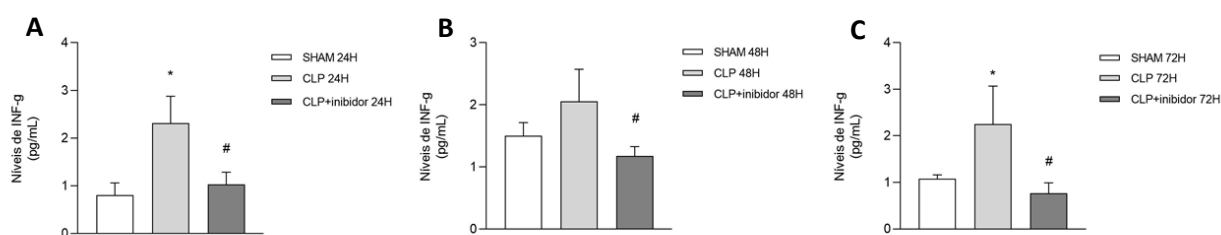


Figura 11: Níveis séricos de INF-  $\gamma$  nos tempos de 24 horas, 48 horas e 72 horas após indução da sepse. 24 horas (A); 48 horas (B); 72 horas (C). Os dados são expressos como média  $\pm$  DP e comparadas com análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey.  $n=10$  cada grupo. \*  $p<0,05$  versus SHAM; #  $p<0,05$  versus CLP.

#### 4.4.4 Citocina IL-10

Com relação a citocina IL-10 o grupo de 48 horas apresentou uma diminuição significativa no grupo CLP em relação ao grupo SHAM. Já o grupo CLP do tempo de 72 horas após a sepse tiveram seus níveis de IL-10 aumentados em relação ao grupo SHAM e ao grupo CLP (Figura 12).

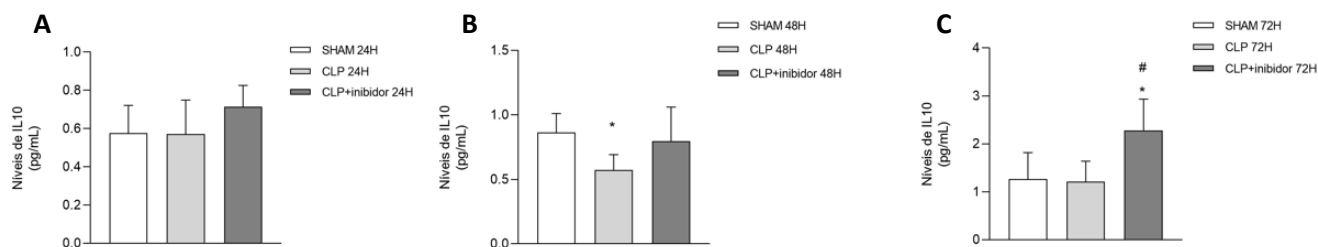


Figura 12: Níveis séricos de IL-10 nos tempos de 24 horas, 48 horas e 72 horas após indução da sepse. 24 horas (A); 48 horas (B); 72 horas (C). Os dados são expressos como média  $\pm$  DP e comparadas com análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey.  $n=10$  cada grupo. \*  $p<0,05$  versus SHAM; #  $p<0,05$  versus CLP.

## 5. DISCUSSÃO

Pesquisas sugerem que os níveis de NP são de valor prognóstico e diagnóstico na avaliação do curso clínico de pacientes sépticos. Segundo Baydar et al., 2009, os níveis de NP estão aumentados significativamente em pacientes sépticos em relação ao grupo controle. Além disso, estudos em animais relatam que a NP pode estar elevada em quadros inflamatórios (Watanabe 2020; Scheffer e Latini 2020). Isso porque, como já citado, a NP é um biomarcador de imunidade celular e, portanto, níveis elevados podem refletir nas complicações sépticas. Desta maneira, este estudo teve como finalidade elucidar a NP e BH4 como possíveis biomarcadores em modelo animal de sepse, por meio de análises em diferentes tempos após a indução da sepse, entendendo primeiramente em qual momento a dosagem seria mais adequada, e posteriormente correlacionando com outras alterações biológicas encontradas no decorrer da doença.

A sepse possui um alto índice de mortalidade além de causar danos em vários sistemas biológicos (Michels et al., 2015). Assim como visto em modelos animais, em humanos há uma alta taxa de mortalidade causada pela sepse, podendo estar relacionado a diversos fatores, como sistema imunológico, respostas fisiológicas a infecção, tratamento precoce, entre outras (Dinarello, 2004; Silva et al., 2004; Singer et al., 2016). Com os resultados encontrados neste estudo através da avaliação da sobrevivência dos animais, o grupo de animais sépticos apresentou uma taxa de sobrevivência de 60%, enquanto o grupo SHAM apresentou uma taxa de sobrevivência de 100%, demonstrando diferença significativa apenas entre os grupos CLP e SHAM.

Alguns autores já citam a relação dos níveis de NP com o prognóstico da gravidade da sepse (Baydar et al., 2009; Sapa et al., 2017). Isso acontece porque geralmente infecções localizadas não ocasionam tanto o aumento da NP, entretanto quando ocorre um processo de inflamação persistente evoluindo para a sepse, a ativação das células de defesa em grande quantidade aumentará os níveis séricos de NP. Por conseguinte, esse agravamento na mortalidade acontece, pois, níveis elevados de NP causam riscos de complicações sépticas devido ao dano ao tecido causado pelo aumento da apoptose celular, que é uma das defesas do organismo contra a infecção por sepse (Hotchkiss et al., 1992; Burleson et al., 1992; Balogh et al., 1992). Além disso, a NP também contribui para o aumento do estresse oxidativo devido a liberação

de EROs, o que também pode causar efeitos citotóxicos e a piora do paciente (Nathan, 1986; Weiss et al., 1993).

Em comparação com outros medidores inflamatórios a NP possui várias vantagens. Por exemplo o INF- $\gamma$ , é uma citocina que está sujeita a degradação rápida e é capaz de se ligar a receptores solúveis ou ligados a células, de modo que a concentração biológica efetiva real indica desvios em relação à concentração mensurável livre obtida. Já na dosagem de NP, esses problemas não aparecerem. Nos aloenxertos renais, os episódios de rejeição foram associados ao aumento dos níveis de NP mesmo quando o INF- $\gamma$  não pode ser detectado (Chin et al., 2008).

Em pacientes que sofreram traumas ou pós-operatórios em terapia intensiva, os níveis séricos de NP foram mostrados para prever o desenvolvimento de complicações sépticas. Em pacientes com politraumatismo, níveis significativamente mais altos são encontrados em pacientes que desenvolvem sepse mais tarde do que em pacientes assépticos. Em pacientes sépticos, as concentrações de NP predizem a sobrevida, os não sobreviventes apresentam níveis de NP mais altos do que os sobreviventes (Strohmaier et al., 1987).

Resultados semelhantes foram mostrados em pacientes com pancreatite aguda (Uomo et al., 1996). Já no momento da admissão no hospital as concentrações de NP permitiram uma predição significativa da sobrevida dos pacientes. O valor preditivo dos níveis séricos de NP foi superior ao de, por exemplo, proteína C reativa.

A enzima SPR desempenha um papel duplo na regulação dos níveis intracelulares da BH4: a SPR catalisa a última etapa da via sintética *de novo* da BH4, que se inicia a partir do GTP, e também participa da via de resgate biossintético da BH4, usando sepiapterina e 7,8-dihidrobiopterina (BH2) como intermediários metabólicos (Hirakawa et al., 2009; Werner et al., 2011). Estudos mostram que a inibição da SPR reduz os sinais de inflamação, além de diminuir significativamente a proliferação de BH4, e conseqüentemente o seu subproduto, a NP. (Fujita et al., 2020, Arai et al., 2020). QM385 é um potente inibidor da enzima SPR com uma concentração inibitória média (IC50) de 1,49 nM, que bloqueia a proliferação de células T, além de possuir uma meia vida mais longa, se comparada ao outros inibidores da enzima, e reduz consideravelmente a atividade da via *de novo* (Cronin et al., 2018). No presente estudo, o grupo CLP+inibidor nos tempos de 24 horas, 48 horas e 72 horas apresentou

resultados de NP e BH4 diminuídos quando comparado com o grupo CLP+inibidor, assim como nos resultados apresentados das citocinas inflamatórias.

Níveis séricos de NP foram dosados em pacientes, e demonstraram ser preditivos para o curso e progressão da sepse, além de auxiliar na avaliação da resposta a terapias (Hamerlinck, 1989). Como biomarcador, os tempos de 24 horas, 48 horas, e 72 horas já são avaliados na literatura, e estes estudos mediram os níveis de NP em grupos sépticos comparados aos grupos controles, comprovando aumentos significativos nos grupos sepse em relação aos grupos controles. Além de mostrarem uma prevalência do aumento dos níveis de NP 1° ao 3° dia após a sepse (Redl et al., 2000; Fisgin et al., 2010; Sapa et al., 2016). Ademais, a NP como biomarcador é biologicamente estável e pode ser facilmente quantificada em fluidos biológicos humanos (Huber et al., 1984; Werner-Fe Imayer et al., 1989; Maggi et al., 1992).

Dessa forma na tentativa de comparar e avaliar os tempos mais precisos para dosagem de NP no decorrer da sepse, os grupos foram analisados nos tempos de 24h, 48h e 72h após a indução da doença. Os resultados em questão demonstraram um aumento significativo quando comparado o grupo CLP ao grupo SHAM nos tempos de 24 horas e 72 horas.

Com os resultados encontrados nesse estudo é possível observar o aumento dos níveis de NP nos grupos CLP quando comparados com os grupos SHAM, corroborando com os resultados encontrados nos níveis de citocinas inflamatórias IL1 $\beta$ , IL-6 e INF-  $\gamma$ , nos tempos de 24 horas, 48 horas e 72 horas, sinalizando dessa forma, a presença de inflamação exacerbada nos animais doentes, simultaneamente com o aumento dos níveis séricos de NP.

Para fundamentar e compreender melhor a via envolvida na produção de NP, a dosagem dos níveis de BH4 também se faz importante. Segundo Kaneko et al., 2003, durante o processo inflamatório há um aumento da via *de novo* e por consequência há um aumento da produção de BH4. Além disso, a BH4 também atua como cofator obrigatório para a atividade de todas as isoformas da óxido nítrico sintase (Mayer et al., 1990; Werner et al., 1998), sendo essencial para a síntese de NO, podendo também levar ao agravamento da inflamação e do estresse oxidativo (Tayeh e Marletta, 1989). Em condições fisiológicas, o metabolismo da BH4 é minuciosamente controlado para manter o adequado balanço homeostático desta molécula. Algumas



doenças multifatoriais de curso crônico, podem apresentar um comprometimento nas concentrações intracelulares de BH4 (Channon, 2004).

Sendo assim, os resultados do presente estudo mostram que no tempo de 72 horas após a indução da sepse houve um aumento significativo nos níveis de BH4 no grupo CLP em relação ao grupo SHAM, e do grupo CLP em relação ao grupo CLP+inibidor, corroborando com os achados da literatura.

Com relação a fisiopatologia da sepse, a mesma possui uma grande expressão de mediadores inflamatórios, favorece uma intensa resposta celular levando a uma resposta inflamatória sistêmica (Cohen, 2002). Esses mediadores inflamatórios, podem ser citocinas inflamatórias que promovem o recrutamento de leucócitos, e o aumento da atividade microbicida, sendo a resposta fundamental para o controle da infecção. Desempenham também papéis importantes no desenvolvimento da sepse, interferindo no prognóstico, evolução e intensidade do dano tecidual. Vários tipos celulares tais como monócitos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células endoteliais participam da resposta inflamatória exacerbada existente na sepse liberando uma grande variedade de mediadores (Oliveira et al., 2011). Essas citocinas, portanto, são secretadas principalmente por células do sistema imune, e podem dividir-se em pró-inflamatórias, como por exemplo IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , que são liberadas em inflamações agudas, crônicas ou dano tecidual; e anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10, que são responsáveis pela diminuição da resposta imune, suprimindo a ação das pró-inflamatórias (Bell et al., 1997; Janeway e Travers, 1997).

A inflamação é uma resposta protetora do organismo que visa eliminar patógenos ou moléculas causadoras de danos celulares e teciduais. A persistência e/ou desequilíbrio dessa resposta pode desencadear um estado de inflamação crônica, acarretando um quadro prejudicial de dano tecidual (Hsieh e Yang, 2013). O processo inflamatório pode ser mediado tanto por células imunes residentes, quanto por células oriundas de infiltrações de vasos sanguíneos (Witte et al., 2010).

Dessa forma, em um quadro de inflamação o patógeno invasor replica e libera seus constituintes, os PAMPs (Kumar et al., 2013; Heckenberg et al., 2014). Esses PAMPs são reconhecidos por PRRs, que são essenciais no sistema imunológico (Sellner et al., 2010; Mook-Kanamori et al., 2011). A detecção dos PAMPs

por receptores de células imunes gera uma cascata de sinalização que ativam fatores de transcrição e liberam mediadores pró e anti-inflamatórios, como proteínas de fase aguda, citocinas, e quimiocinas, que são necessários para eliminar o invasor (Iwasaki & Medzhitov, 2010). Dentre esses mediadores que são expressos e secretados estão as citocinas pró inflamatórias (como por exemplo: TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , IL-6 e IFN).

Um estudo avaliou um amplo painel de citocinas e mostrou que IL1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 foram aumentados na fase aguda da sepse em pacientes graves e não graves. Além disso, os níveis de IL-10 (dias 1, 2 e 4), IL-6 (dias 2 e 4) e IL-8 (dia 4) aumentaram em pacientes críticos em comparação com pacientes não críticos (Matsumoto et al., 2018; Barichello et al., 2022). Por conseguinte, na intenção de compreender e avaliar a resposta inflamatória dos animais nos grupos do presente estudo, foram analisados os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, INF-  $\gamma$ . Foi observado um aumento significativo no grupo CLP em relação ao grupo SHAM, e em relação ao grupo CLP+inibidor nos tempos de 24 horas, e 72 horas. Síntese e secreção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$  e a NP são eventos comuns em pacientes graves.

Considerando que a IL-1 $\beta$  é um marcador inicial da sepse, pois expressa efeitos pró-inflamatórios que contribuem para uma intensa resposta celular ao patógeno, além de ter a capacidade de liberar mediadores secundários (Imamura et al., 2011; Oliveira et al., 2018), alguns autores também apontam a relação entre os níveis de IL-1 $\beta$  e NP, sendo tal citocina a principal estimuladora da via de síntese de NP, o seu aumento estaria relacionado com o aumento da atividade da via *de novo* (Maes et al., 2012, Parker et al., 2013; Ghisoni et al., 2015).

Já na análise da citocina anti-inflamatória IL-10 foi observada um aumento significativo no tempo de 48 horas no grupo SHAM em relação ao grupo CLP. E no tempo de 72 horas um aumento significativo do grupo CLP+inibidor em relação aos grupos SHAM e CLP. Desse modo, compreende-se que além das citocinas estarem relacionadas com o processo inflamatório da sepse, elas também estão diretamente relacionadas com a regulação da via *de novo*. Evidenciando que o aumento da NP pode ser atribuído à ativação de células imunes e consequente secreção de citocinas inflamatórias (Franscini et al., 2003).

Embora ainda não tenha sido elucidado um biomarcador ideal para o diagnóstico precoce da sepse, a busca por ferramentas se faz importante. Monitorar mediadores específicos do sistema imunológico pode fornecer informações mais completas sobre a situação do paciente, prever complicações, e até mesmo auxiliar em estratégias terapêuticas (Fisgin et al., 2010; Sapa et al., 2016), pois tornam possível diferenciar infecções e avaliar a gravidade do processo inflamatório (Pierrakos e Vincent, 2010).

## 6. CONCLUSÃO

A NP já é considerada um biomarcador para imunidade mediada por células, e no presente estudo sugere-se que a NP pode ser um bom parâmetro para investigação da sepse em modelo animal.

Além disso os níveis de NP e BH4 demonstraram estar significativamente aumentados nos tempos de 24 horas e 72 horas após a indução da sepse. Assim como as citocinas inflamatórias, trazendo a ideia que tais tempos parecem ser bons para o prognóstico da sepse. Além disso, o QM385 se demonstrou eficaz ao inibir a via de síntese de NP e BH4. Esses resultados dos grupos CLP+inibidor podem até mesmo serem utilizados para correlacionar o aumento da NP e BH4 com o aumento da inflamação nos animais sépticos e conseqüentemente ao agravo da sepse. Porém mais estudos serão necessários para compreender e correlacionar a sobrevida com a gravidade dos animais sépticos.

## REFERÊNCIAS

Abraham E. New Definitions for Sepsis and Septic Shock: Continuing Evolution but With Much Still to Be Done. *JAMA*.2016; 315(8):757-59.

Altindag ZZ, Sahin G, Inanici F, Hascelik Z. Urinary neopterin excretion and dihydropteridine reductase activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*. 1998; 18(3): 107-111.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine*. 2001; 29(7): 1303-1310.

Angus DC, Van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013; 369: 840-851.

Annane D, Aegerter P, Jars-Guinestre MC, Guidet B. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003; 168(2): 165-172.

Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *The Lancet*. 2005; 365(9453): 63-78.

Anwaar I, Gottsater A, Hedblad B, Palmqvist B, Mattiasson I, Lindgarde F. Endothelial derived vasoactive factors and leukocyte derived inflammatory mediators in subjects with asymptomatic atherosclerosis. *Angiology*. 1998; 49(12): 957-966.

Arai H, Takahashi R, Sakamoto Y, Kitano T, Mashita O, Hara S, Yoshikawa S, Kawasaki K, Ichinose H. Peripheral tetrahydrobiopterin is involved in the pathogenesis of mechanical hypersensitivity in a rodent postsurgical pain model. *Pain*. 2020;161(11):2520-2531.

Balogh D, Lammer H, Kornberger E, Stuffer M, Schönitzer D. Neopterin plasma levels in burn patients. *Burns*. 1992;18(3):185-8.

Barichello T, Generoso JS, Singer M, Dal-Pizzol F. Biomarkers for sepsis: more than just fever and leukocytosis-a narrative review. *Crit Care*. 2022;26(1):14.

Baydar T, Yuksel O, Sahin TT, Dikmen K, Girgin G, Sipahi H, Kurukahvecioglu O, Bostanci H, Sare M. Neopterin as a prognostic biomarker in intensive care unit patients. *J Crit Care*. 2009;24(3):318-21.

Bell MJ, Kochanek PM, Doughty LA, Carcillo JA, Adelson PD, Clark RS, Wisniewski SR, Whalen MJ, DeKosky ST. Interleukin-6 and interleukin-10 in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in children. *J Neurotrauma*. 1997;14(7):451-7.

Berdowska A, Zwirska-Korczala K. Neopterin measurement in clinical diagnosis. *J Clin Pharm Ther.* 2001; 26(5):319-29.

Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology & therapeutics.* 2001; 69(3), 89-95.

Bochud, P. Y., Bonten, M., Marchetti, O., & Calandra, T. (2004). Antimicrobial therapy for patients with severe sepsis and septic shock: an evidence-based review. *Critical Care Medicine*, 32(11), S495-S512.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992; 101(6):1644-55.

Bracht H, Hafner S, Weiss M. Sepsis-update: definition und Epidemiologie. *AINS-Anästhesiologie Intensivmedizin Notfallmedizin Schmerztherapie.* 2019; 54(01): 10-20.

Brant EB, Martin-Gill C, Callaway CW, Angus DC, Seymour CW. Prehospital identification of community sepsis using biomarkers of host response. *Intensive care medicine.* 2020; 46(4), 823-824.

Brooks HF, Osabutey CK, Moss RF, Andrews PLR, Davies DC. Caecal ligation and puncture in the rat mimics the pathophysiological changes in human sepsis and causes multi-organ dysfunction. *Metabolic brain disease.* 2007; 22(3): 353-373.

Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nature reviews Drug discovery.* 2005; 4(10): 854-865.

Burleson DG, Johnson A, Salin M, Mason AD Jr, Pruitt BA Jr. Identification of neopterin as a potential indicator of infection in burned patients. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1992; 199(3):305-10.

Chalupka AN, Talmor D. The economics of sepsis. *Critical care clinics.* 2012; 28(1): 57-76.

Channon KM. Tetrahydrobiopterin: regulator of endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14(8):323-7.

Chin GK, Adams CL, Carey BS, Shaw S, Tse WY, Kaminski ER. The value of serum neopterin, interferon-gamma levels and interleukin-12B polymorphisms in predicting acute renal allograft rejection. *Clin Exp Immunol.* 2008;152(2):239-44.

Cinel I, Dellinger RP. Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Current opinion in infectious diseases.* 2007; 20(4): 345-352.

Cohen J, Vincent JL, Adhikari NK, Machado FR., Angus DC, Calandra T, Pelfrene E. Sepsis: a roadmap for future research. *The Lancet infectious diseases*. 2015;15(5): 581-614.

Conde KA, Silva E, Silva CO, Ferreira E, Freitas FG, Castro I, Rea-Neto A, Grion CM, Moura AD, Lobo SM, Azevedo LC, Machado FR. Differences in sepsis treatment and outcomes between public and private hospitals in Brazil: a multicenter observational study. 2013;8(6): e64790.

Cronin SJ, Seehus C, Weidinger A, Talbot S, Reissig S, Seifert M, Kreslavsky T. The metabolite BH4 controls T cell proliferation in autoimmunity and cancer. *Nature*. 2018; 563(7732): 564-568.

Cronin SJF, et al. The metabolite BH4 controls T cell proliferation in autoimmunity and cancer. *Nature*. 2019;572(7769): E18.

Dale RC, Brilot F, Fagan E, Earl J. Cerebrospinal fluid neopterin in paediatric neurology: a marker of active central nervous system inflammation. *Dev Med Child Neurol*. 2009 Apr;51(4):317-23.

Dal-Pizzol F, Ritter C. À procura do Santo Graal: aonde vamos com os biomarcadores na sepse? *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2012; (24):117-118.

De Maio A, Torres MB, Reeves RH. Genetic determinants influencing the response to injury, inflammation, and sepsis. *Shock*. 2005; 23(1): 11-17.

de Paula Martins R, Ghisoni K, Lim CK, Aguiar Jr AS, Guillemin GJ, Latini A. Neopterin preconditioning prevents inflammasome activation in mammalian astrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018; 115: 371-382.

Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Osborn TM. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, *Intensive care medicine*. 2012; 39(2): 165-228.

Dellinger RP. Cardiovascular management of septic shock. *Critical care medicine*. 2003; 31(3): 946-955.

Dinarello CA. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J Endotoxin Res*. 2004;10(4):201-22.

Faist E, Storck M, Hültner L, Redl H, Ertel W, Walz A, Schildberg FW. Functional analysis of monocyte activity through synthesis patterns of proinflammatory cytokines and neopterin in patients in surgical intensive care. 1992; 112(3):562-72.

Fisgin NT, Aliyazicioglu Y, Tanyel E, Coban AY, Ulger F, Zivalioglu M, Esen S, Leblebicioglu H. The value of neopterin and procalcitonin in patients with sepsis. *South Med J*. 2010;103(3):216-9.

Franscini N, Blau N, Walter RB, Schaffer A, Schoedon G. Critical role of interleukin-1 $\beta$  for transcriptional regulation of endothelial 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003; 23(11):50-53.

Fuchs D, Spira TJ, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Felmayer GW, Wachter H. Neopterin as a predictive marker for disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin chem*. 1989; 35(8): 1746-1749.

Fuchs D, Weiss G, Reibnegger G, Wachter H. The role of neopterin as a monitor of cellular immune activation in transplantation, inflammatory, infectious, and malignant diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1992; 29(3-4):307-41.

Fuchs D, Weiss G, Wachter H. Neopterin, biochemistry and clinical use as a marker for cellular immune reactions. *International archives of allergy and immunology*. 1993; 101(1): 1-6.

Fujita M, Scheffer DDL, Turnes BL, Cronin SJF, Latrémolière A, Costigan M, Woolf CJ, Latini A, Andrews NA. Sepiapterin Reductase Inhibition Leading to Selective Reduction of Inflammatory Joint Pain in Mice and Increased Urinary Sepiapterin Levels in Humans and Mice. *Arthritis Rheumatol*. 2020;72(1):57-66.

Ghisoni K, de Paula Martins R, Barbeito L, Latini A. Neopterin as a potential cytoprotective brain molecule. *Journal of psychiatric research*. 2015; 71: 134-139.

Gibot S, Bene MC, Noel R, Massin F, Guy J, Cravoisy A, Charles P E. Combination biomarkers to diagnose sepsis in the critically ill patient. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186(1):65–71.

Godai K, Uemasu J, Kawasaki H. Clinical significance of serum and urinary neopterins in patients with chronic renal disease. *Clin Nephrol*. 1991;36(3):141-6.

Gomez-Jimenez J, Martín MC, Sauri R, Segura RM, Esteban F, Ruiz JC, Salgado A. Interleukin-10 and the monocyte/macrophage-induced inflammatory response in septic shock. *J Infect Dis*. 1995; 171(2):472– 475.

Grozdanovski K, Milenkovic Z, Demiri I, Spasovska K. Prediction of outcome from community-acquired severe sepsis and septic shock in tertiary-care university hospital in a developing country. *Crit Care Res Pract*. 2012.

Hagberg L, Dotevall L, Norkrans G, Wachter H, Fuchs D. Cerebrospinal fluid neopterin concentrations in central nervous system infection. *J Infect Dis*. 1993;168(5):1285-8.

Hamerlinck FFV. Neopterin: a review. *Experimental dermatology*. 1999; 8(3): 167-176.



Heckenberg SG, Brouwer MC, van de Beek D. Bacterial meningitis. *Handb Clin Neurol*. 2014;121:1361-75.

Hensler T, Sauerland S, Lefering R, Nagelschmidt M, Bouillon B, Andermahr J, Neugebauer EA. The clinical value of procalcitonin and neopterin in predicting sepsis and organ failure after major trauma. *Shock*. 2003;20(5):420-6.

Hirakawa H, Sawada H, Yamahama Y, Takikawa S-I, Shintaku H, Hara A, et al. Expression analysis of the aldo-keto reductases involved in the novel biosynthetic pathway of tetrahydrobiopterin in human and mouse tissues. *J Biochem*. 2009;146(1):51–60.

Hoffmann G, Frede S, Kenn S, Smolny M, Wachter H, Fuchs D, Grote J, Rieder J, Schobersberger W. Neopterin-induced tumor necrosis factor-alpha synthesis in vascular smooth muscle cells in vitro. *Int Arch Allergy Immunol*. 1998;116(3):240-5.

Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med*. 1999;27(7):1230-51.

Hsieh HL, Yang CM. Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *Biomed Res Int*. 2013;2013:484613.

Huber C, Fuchs D, Hausen A. Pteridines as a new marker to detect human T cells activated by allogeneic or modified self major histocompatibility complex (MHC) determinants. *J Immunol*. 1983;130:1047–1050.

Huber Ch, Batchelor JR, Fuchs D, Hausen A, Lang A, Niederwieser D, Wachter H. Immune response-associated production of neopterin. *Journal of Experimental Medicine*. 1984; 160(1): 310-316.

Imamura Y, Wang H, Matsumoto N, Muroya T, Shimazaki J, Ogura H, Shimazu T. Interleukin-1 $\beta$  causes long-term potentiation deficiency in a mouse model of septic encephalopathy. *Neuroscience*. 2011;187:63-9.

Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010;327(5963):291-5.

Janeway CA. Jr, Travers P. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Garland Science. 3rd edition, 1997.

Janeway Jr CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*. 2002; 20(1): 197-216.

Janeway Jr CA. How the immune system protects the host from infection. *Microbes and infection*. 2001; 3(13): 1167-1171.

Kaneko YS, Mori AK, Nakashima I, Nagatsu A. Peripheral administration of lipopolysaccharide enhances the expression of guanosine triphosphate

- cyclohydrolase I mRNA in murine locus coeruleus. *Neuroscience*. 2003; 116(1):7-12.
- Kaufmann W. Water-electrolyte balance in acute abdominal diseases. *Die Medizinische Welt*. 1963; 50: 2557-2564.
- Kaukonen KM, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *Jama*. 2014; 311(13):1308-16.
- Kondera-Anasz Z, Mertas A, Jochemczyk J, Starzewski J. Stezenie neopteryny w surowicy krwi w wybranych chorobach tarczycy. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. 1997; 97: 418-425.
- Kronberger P, Weiss G, Tschmelitsch J, et al. (1995) Predictive value of urinary neopterin in patients with lung cancer. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 33, 831±837.
- Kumar G, Kumar N, Taneja A, Kaleekal T, Tarima S, McGinley E, Milwaukee Initiative in Critical Care Outcomes Research (MICCOR) Group of Investigators. Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000–2007). *Chest*. 2011; 140(5):1223-1231.
- Kumar S, Ingle H, Prasad DV, Kumar H. Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. *Crit Rev Microbiol*. 2013;39(3):229-46.
- Latremoliere A, Latini A, Andrews N, Cronin SJ, Fujita M, Gorska K, Woolf CJ. Reduction of neuropathic and inflammatory pain through inhibition of the tetrahydrobiopterin pathway. *Neuron*. 2015; 86(6): 1393-1406.
- Machado FR, Cavalcanti AB, Bozza FA, Ferreira EM, Angotti Carrara FS, Sousa JL, Caixeta N, Salomao R, Angus DC, Pontes Azevedo LC; SPREAD Investigators; Latin American Sepsis Institute Network. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(11):1180-1189.
- Machado FR, Cavalcanti AB, Bozza FA, Ferreira EM, Carrara FSA, Sousa JL, Zajac SR. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis Prevalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2017; 17(11), 1180-1189.
- Maes M, Twisk FN, Kubera M, Ringel K, Leunis JC, Geffard M. Increased IgA responses to the LPS of commensal bacteria is associated with inflammation and activation of cell-mediated immunity in chronic fatigue syndrome. *J Affect Disord*. 2012;136(3):909-17.
- Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Rugiu FS, De Carli M, Ricci M, Romagnani S. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4

on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol.* 1992;148(7):2142-7.

Matsumoto H, Ogura H, Shimizu K, Ikeda M, Hirose T, Matsuura H, Kang S, Takahashi K, Tanaka T, Shimazu T. The clinical importance of a cytokine network in the acute phase of sepsis. *Sci Rep.* 2018;8(1):13995.

Micek ST, Roubinian N, Heuring T, Bode M, Williams J, Harrison C, Kollef MH. Before-after study of a standardized hospital order set for the management of septic shock. *Crit Care Med.* 2006; 34(11): 2707-2713.

Michels M, Vieira AS, Vuolo F, Zapelini HG, Mendonça B, Mina F, Domingui D, Steckert A, Schuck PF, Quevedo J, Petronilho F, Dal-Pizzol F. The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment. *Brain, Behavior, and Immunity.* 2015; 43: 54-59.

Millner MM, Franthal W, Thalhammer GH, Berghold A, Aigner RM, Fuger GF, Reibnegger G. Neopterin concentrations in cerebrospinal fluid and serum as an aid in differentiating central nervous system and peripheral infections in children. *Clinical Chemistry.* 1998; 44(1):161-167.

Mook-Kanamori BB, Geldhoff M, van der Poll T, van de Beek D. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(3):557-91.

Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CG, Tervaert JW. Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med.* 2000;26:883– 892.

Muller MM, Curtius HCh, Herold M, Huber Ch. Neopterin in clinical practice. *Clinica Chimica Acta.* 1991; 201(1-2):1-16.

Muller TF, Vogl M, Neumann MC, Lange H, Grimm M, Muller MM. Noninvasive monitoring using serum amyloid A and serum neopterin in cardiac transplantation. *Clinica Chimica Acta.* 1998; 276(1): 63-74.

Murr C, Widner B, Wirleitner B, Fuchs D. Neopterin as a marker for immune system activation. *Current drug metabolism.* 2002; 3(2): 175-187.

Murr Ch, Bergant A, Widschwendter M, Heim K, SchroËcksadel H, Fuchs D. Neopterin is an independent prognostic variable in females with breast cancer. *Clinical Chemistry.* 1999; 45(11): 1998-2004.

Nasonov EL, Samsonov M Yu, Chichasova NV. Neopterin: Laboratornyi marker aktivatsii kletchnogo immuniteta pri revmatoidnom artrite. *Terapevticheski Arkhiv.* 1998; 70: 28-31.

Neira RAQ, Hamacher S, Japiassú AM. Epidemiology of sepsis in Brazil: Incidence, lethality, costs, and other indicators for Brazilian Unified Health System hospitalizations from 2006 to 2015. 2018; 13(4): e0195873.

Oda K, Arai T, Nagase M. Increased serum and urinary neopterin in nephrotic syndrome indicate cell-mediated immune dysfunction. *American Journal of Kidney Diseases*. 1999; 34(4): 611-617.

Oettl K, Wirleitner B, Baier-Bitterlich G, Grammer T, Fuchs D, Reibnegger G. Formation of oxygen radicals in solutions of 7,8-dihydroneopterin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999; 264(1): 262-267.

Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas e dor. *Revista Brasileira Anestesiologia*. 2011; 61: 2: 255-265

Ozger HS, Dizbay M, Corbacioglu SK, Aysert P, Demirbas Z, Tunccan OG, Caglar K. The prognostic role of neopterin in COVID-19 patients. *J Med Virol*. 2021; 93(3): 1520- 1525.

Parillo J, Parker M, Natanson C, Suffredini, AF, Danner RL, Cunnion RE, Ognibene FP. Septic shock: advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunctions, and therapy. *Ann Intern Med*. 1990; 113: 227–42.

Parker DC, Mielke MM, Yu Q, Rosenberg PB, Jain A, Lyketsos CG, Fedarko NS, Oh ES. Plasma neopterin level as a marker of peripheral immune activation in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2013;28(2):149-54.

Pascual C, Karzai W, Meier-Hellmann A, Oberhoffer M, Horn A, Bredle D, Reinhart K. Total plasma antioxidant capacity is not always decreased in sepsis. *Critical Care Medicine*. 1998; 26(4): 705- 709.

Perner A, Rhodes A, Venkatesh B, Angus DC, Martin-Loeches I, Preiser JC, Opal SM. Sepsis: frontiers in supportive care, organization and research. *Intensive Care Med* 2017;43(4):496–508.

Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care*. 2010;14(1): R15.

Pittet D, Rangel-Frausto S, Li N, Tarara D, Costigan M. Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: incidence, morbidities and outcomes in surgical ICU patients. *Intensive Care Med*. 1995; 21: 302–09.

Redl H, Schlag G, Tögel E, Assicot M, Bohuon C. Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: relationship to cytokines and neopterin. *Crit Care Med*. 2000;28(11):3659-63.

Reibnegger G, Aichberger C, Fuchs D, Hausen, A, Spielberger M, Werner ER, Wachtehr H. Posttransplant neopterin excretion in renal allograft recipients ± a reliable diagnostic aid for acute rejection and a predictive marker of long-term graft survival. *Transplantation*. 1991; 52(1): 58-63.

Reinhart K, Meisner M. Biomarkers in the critically ill patient: procalcitonin. Crit Remick DG. Pathophysiology of sepsis. The American journal of pathology. 2007; 170(5): 1435-1444.

Riedel S. Procalcitonin and the role of biomarkers in the diagnosis and management of sepsis. *Diagn Microbiol Infec Dis.* 2012;73:221– 227.

Roccatello D, Formica M, Cavalli G, Quattrocchio G, Aimo G, Polloni R, Piccoli G. Serum and intracellular detection of cytokines in patients undergoing chronic hemodialysis. *Artical Organs.* 1992; 16(2):131-140.

Roumen RM, Redl H, Schlag G, Zilow G, Sandtner W, Koller W, Hendriks T, Goris RJ. Inflammatory mediators in relation to the development of multiple organ failure in patients after severe blunt trauma. *Crit Care Med.* 1995;23(3):474-80.

Sapa A, Rak A, Wybieralska M, Machoń J, Krzywonos-Zawadzka A, Zawadzki K, Welna M, Woźniak M. Diagnostic usefulness of sCD163, procalcitonin and neopterin for sepsis risk assessment in critically ill patients. *Adv Clin Exp Med.* 2017;26(1):101-108.

Scheffer DDL, Latini A. Exercise-induced immune system response: Anti-inflammatory status on peripheral and central organs. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(10):165823

Schumacher M, Halwachs G, Tatzber F, Fruhwald FM, Zweiker R, Watzinger N, Klein W. Increased neopterin in patients with chronic and acute coronary syndromes. *Journal of the American College of Cardiology.* 1997; 30(3): 703-707.

Sellner J, Täuber MG, Leib SL. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial CNS infections. *Handb Clin Neurol.* 2010;96:1-16.

Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, et al. Assessment of clinical criteria for sepsis: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016 Feb;315(8):762-74.

Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, et al. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016 Feb;315(8):775-87.

Silva E, de Almeida P, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Knobel E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care.* 2004;8(4): 251-60.

Sims CR, Nguyen TC, Mayeux PR. Could biomarkers direct therapy for the septic patient? *J Pharmacol Exp Ther.* 2016;357(2):228–39.

- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*. 2016; 315(8):801-10.
- Stoller J, Halpin L, Weis M, Aplin B, Qu W, Georgescu C, Nazzal M. Epidemiology of severe sepsis: 2008-2012. *Journal of critical care*. 2016; 31(1): 58-62.
- Strohmaier W, Redl H, Schlag G, Inthorn D. D-erythro-neopterin plasma levels in intensive care patients with and without septic complications. *Crit Care Med*. 1987;15(8):757-60.
- Tang BM, Eslick GD, Craig JC, McLean AS. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:210–7.
- Taniguchi LU, Bierrenbach AL, Toscano CM, Schettino GP, Azevedo LCP. Sepsis-related deaths in an emerging country: an analysis of the Brazilian National Mortality Registry from 2002 to 2010. *Critical Care*. 2014; 18(6): 1-7.
- Tayeh MA, Marletta MA. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J BiolChem*. 1989;264(33):19654-8.
- Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends in immunology*. 2002; 23(6): 301-304.
- Uomo G, Spada OA, Manes G, Feola B, Misso S, Cavallera A, Rabitti PG. Neopterin in acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol*. 1996;31(10):1032-6.
- Van Engelen TS, Wiersinga WJ, Scicluna BP, van der Poll T. Biomarkers in sepsis. *Critical care clinics*. 2018; 34(1):139-152.
- Wachter H, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER. (1989). Neopterin as marker for activation of cellular immunity: immunologic basis and clinical application. *Adv Clin Chem*. 1989; 27: 81-141.
- Warren H. Strategies for the treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 1997; 336: 952–53.
- Watanabe T. Neopterin derivatives - a novel therapeutic target rather than biomarker for atherosclerosis and related diseases. *Vasa*. 2021;50(3):165-173.
- Weighardt H, Holzmann B. Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis. *Immunobiology*. 2008; 212(9): 715-722.
- Weiss G, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Werner-Felmayer G, Wachter H. Neopterin modulates toxicity mediated by reactive oxygen and chloride species. *FEBS Letters*. 1993; 321(1): 89–92.
- Weiss G, Widner B, Zoller H, Schobersberger W, Fuchs D. Immune response and iron metabolism. *British Journal of Anaesthesia*. 1998; 81: 6-9.

Weiss G, Willeit J, Kiechl S, Fuchs D, Jarosch E, Oberhollenzer F, Wachter H. Increased concentrations of neopterin in carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1994; 106(2): 263-271.

Werner ER, Bichler A, Daxenbichler G, Fuchs D, Fuith LC, Hausen A, Wachter H. Determination of neopterin in serum and urine. *Clin chem*. 1987; 33(1), 62-66.

Werner ER, Blau N, Thöny B. Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. *Biochem J*. 2011;438(3):397-414.

Werner ER, Werner-Felmayer G, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Yim JJ, Wachter H. Tetrahydrobiopterin biosynthetic activities in human macrophages, THP-1 and T 24 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1990; 265(6): 3189-3192.

Werner-Felmayer G, Werner ER, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Wachter H. Tumour necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide enhance interferon-induced tryptophan degradation and pteridine synthesis in human cells. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1989;370(9):1063-9.

Whang KT, Vath SD, Becker KL, Snider RH, Nysten ES, Muller B, Li Q, Tamarkin L, White JC. Procalcitonin and proinflammatory cytokine interactions in sepsis. *Shock*. 2000;14(1):73-8.

Wijemanne S, Jankovic J. Dopa-responsive dystonia—clinical and genetic heterogeneity. *Nature reviews neurology*. 2015; 11(7): 414.

Witte ME, Geurts JJ, de Vries HE, van der Valk P, van Horsen J. Mitochondrial dysfunction: a potential link between neuroinflammation and neurodegeneration? *Mitochondrion*. 2010;10(5):411-8.

Yao YM, Yu Y, Wang YP, Tian HM, Sheng ZY. Elevated serum neopterin level: its relation to endotoxaemia and sepsis in patients with major burns. *Eur J Clin Invest*. 1996;26(3):224-30.

Zangerle R, Sarcletti M, Gallati H, Reibnegger G, Wachter H, Fuchs D. Correlation of body mass index with urinary neopterin in individuals infected with human immunodeficiency virus. *International Archives of Allergy and Immunology*. 1994; 104(2): 150-154.

## ANEXOS

## ANEXO A - Aprovação do comitê de ética no uso de animais.



Universidade do Extremo Sul Catarinense  
Comissão de Ética no Uso de Animais



## CERTIFICADO


Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **08/09/2020**.

<b>Título do projeto</b>	Neopterina como biomarcador para diagnóstico de Sepsis
<b>Project title</b>	Neopterin as a biomarker for sepsis diagnosis
<b>Número do protocolo</b> <b>Protocol number</b>	58/2020
<b>Pesquisador principal</b> <b>Principal Investigator</b>	Felipe Dal-Pizzol
<b>Pesquisadores</b> <b>Researchers</b>	Luana Cucker Alves, Andrielle da Silva Vieira, Mariane Rocha Abatti, Emily Córneo, Monique Michels, Amanda Indalécio Goulart, Diogo Dominguini, Filipe Fernandes Gabriel, Rodrigo Dias, Natalli Studnicka, Elizandra Ross, Ramsés Martins Kejelin, Mariane Oliveira, Luana Rocha, Natan Mattos, Heloísa de Medeiros Borges.

<b>Finalidade</b>	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
<b>Vigência da autorização</b>	10/10/2020 a 10/10/2021
<b>Espécie/linhagem/raça</b>	Rato heterogênico/ Wistar
<b>Idade/Peso</b>	2 meses / 200-300g
<b>Número de animais</b>	Masculino = 72
<b>Procedência</b>	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma-SC, 08 de setembro de 2020.

  
Fernando Carvalho  
Coordenador da CEUA



## ANEXO B – Adendo da aprovação do comitê de ética no uso de animais.



Universidade do Extremo Sul Catarinense  
Comissão de Ética no Uso de Animais



### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **20/04/2021**.

<b>Título do projeto</b>	Neopterina como biomarcador para diagnóstico de Sepsis
<b>Project title</b>	Neopterin as a biomarker for sepsis diagnosis
<b>Número do protocolo Protocol number</b>	58/2020 adendo
<b>Pesquisador principal Principal Investigator</b>	Felipe Dal-Pizzol
<b>Pesquisadores Researchers</b>	Luana Cucker Alves, Andrielle da Silva Vieira, Mariane Rocha Abatti, Emily Córneo, Monique Michels, Amanda Indalécio Goulart, Diogo Domingui, Felipe Fernandes Gabriel, Rodrigo Dias, Natalli Studnicka, Elizandra Ross, Ramsés Martins Kejelin, Mariane Oliveira, Luana Rocha, Natan Mattos, Heloísa de Medeiros Borges.

<b>Finalidade</b>	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
<b>Vigência da autorização</b>	10/10/2020 a 10/10/2021
<b>Espécie/linhagem/raça</b>	Rato heterogênico/ Wistar
<b>Idade/Peso</b>	2 meses / 200-300g
<b>Número de animais</b>	Masculino = 50
<b>Procedência</b>	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma-SC, 20 de abril de 2021

*Josiane Budni*  
Josiane Budni

Coordenadora da CEUA

## ANEXO C – Ata de Apresentação Pública de Mestrado



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 609 de 14.03.2019

---

### ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – N° 392

Com início às 16h (dezesesseis horas) do dia trinta e um de maio de 2022 (dois mil e vinte e dois), realizou-se, via ferramenta digital *Google Meet*, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de Luana Cucker Alves, sob a orientação do Prof. Dr. FELIPE DAL PIZZOL, intitulada “INVESTIGAÇÃO DA NEOPTERINA E BH4 COMO BIOMARCADOR PREDITIVO DE GRAVIDADE EM MODELO ANIMAL DE SEPSE”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Jaqueline da Silva Generoso (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Profa. Dra. Tatiana Barichello (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, e Profa. Dra. Cristiane Damiani Tomasi (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: APROVADA, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 18h00 (dezoito horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, Coordenador do Programa. Criciúma, 31 (trinta e um) de maio de 2022 (dois mil e vinte e dois).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck  
Coordenador do PPGCS

Fernanda Nunes Peruchi  
Assistente Administrativo