

CLARA RODRIGUES ALVES DE OLIVEIRA

**Avaliação prospectiva das atividades fagocitária e
quimiotática de neutrófilos humanos quando
submetidos ao plasma de pacientes sépticos**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2012

CLARA RODRIGUES ALVES DE OLIVEIRA

**Avaliação prospectiva das atividades fagocitária e
quimiotática de neutrófilos humanos quando
submetidos ao plasma de pacientes sépticos**

Tese apresentada no curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.

Co-orientador: Prof. Jérôme Pugin

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora: Prof^a. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Renato de Lima Santos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Francisco José Penna

DEPARTAMENTO DE CLINICA MÉDICA

Coordenador: Prof^a. Anelise Impeliziere Nogueira

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr. (Coordenador)

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha (Subcoordenador)

Prof. Antônio Luiz Pinto Ribeiro

Prof^a. Denise Utsch Gonçalves

Prof. Antônio Lúcio Teixeira Jr.

Ensinamento

Minha mãe achava estudo
a coisa mais fina do mundo.
Não é.
A coisa mais fina do mundo é o sentimento.
Aquele dia de noite, o pai fazendo serão,
ela falou comigo:
“Coitado, até essa hora no serviço pesado”.
Arrumou pão e café, deixou tacho no fogo com água quente,
Não me falou em amor.
Essa palavra de luxo.

Adélia Prado

RESUMO

A resposta imune inata encontra-se alterada nos pacientes sépticos, mas a capacidade de mediadores presentes no plasma séptico de influenciar as respostas fagocitária e quimiotática dos neutrófilos ainda é pouco compreendida. O objetivo do presente estudo foi o de avaliar as influências do plasma séptico sobre funções da imunidade inata exercidas por neutrófilos sadios (células HL-60 diferenciadas), comparando-as com aquelas determinadas pelo plasma obtido de pacientes com SIRS não-infecciosa e sem SIRS. Amostras de plasma foram coletadas no momento do diagnóstico de sepse ou SIRS e nos dias 2, 3, 5, 10, 20 e 28, ou até o óbito ou alta hospitalar. A atividade fagocitária dos neutrófilos foi avaliada por citometria de fluxo após 20 e 50 minutos de incubação e a atividade quimiotática em resposta à fMLP e à IL-8 foi quantificada a partir da tecnologia de ensaio fluorométrico de microvolume. Ao todo foram incluídos 66 pacientes: sepse (n=31), SIRS não-infecciosa (n=24) e sem SIRS (n=11). A atividade fagocitária dos neutrófilos aos 20 e 50 minutos, sob a influência de plasma coletado à inclusão, foi significativamente maior no grupo séptico quando comparada aos outros dois grupos de estudo ($p=0.009$, $p=0.03$, respectivamente). Essa diferença permaneceu significativa aos 50 minutos nos dias 2 e 5 ($p=0.02$, $p=0.001$, respectivamente). Considerando apenas os pacientes com SIRS (n=54), a atividade fagocitária foi significativamente superior após 20 minutos no grupo séptico com plasma coletado no momento da inclusão no estudo ($p=0.01$), com uma tendência a ser significativa aos 50 minutos ($p=0.06$). Restringindo a análise aos 12 pacientes sépticos que sobreviveram até o 28º dia, a atividade fagocitária aumentou significativamente ao longo do período avaliado e a diferença entre os índices de fagocitose mensurados à inclusão e no 28º dia foi significativa para ambos os tempos de incubação ($p=0.04$ para ambos). A quimiotaxia dos neutrófilos em resposta à fMLP e à IL-8, sob a influência de plasma coletado à inclusão, foi significativamente reduzida pelo plasma dos pacientes sépticos quando comparada aos outros dois grupos de estudo ($p=0.07$, $p<0.0001$, respectivamente). Considerando apenas os pacientes com SIRS, o plasma séptico determinou uma redução mais acentuada da atividade quimiotática dependente de IL-8 no momento da inclusão e nos dias 2 e 3 ($p=0.05$, $p=0.006$, $p=0.005$, respectivamente). Entre os pacientes sépticos que sobreviveram até o 28º dia, a atividade quimiotática em resposta à IL-8 aumentou ao longo do período e a diferença entre o momento da inclusão e o 28º dia foi significativa ($p=0.001$). Para todos os momentos de coleta do plasma, não houve diferença entre os níveis plasmáticos de IL-8 entre os pacientes sépticos e com SIRS não-infecciosa. Atividades fagocitária aumentada e quimiotática reduzida correlacionaram-se à mortalidade em 28 dias. Considerando todos os pacientes avaliados, uma correlação significativa entre tais atividades e os escores de gravidade foi observada. Pelo exposto, podemos concluir que o plasma de pacientes sépticos determina aumento da atividade fagocitária de neutrófilos sadios e que essa elevação continua progressivamente até o 28º dia. De maneira oposta, o plasma séptico reduz a atividade quimiotática dos neutrófilos em resposta à fMLP e à IL-8. Entretanto, essa atividade é recuperada ao longo do período de avaliação, atingindo valores elevados no 28º dia de seguimento.

Palavras-chave: sepse, neutrófilos, plasma, fagocitose, quimiotaxia

ABSTRACT

Innate immune responses are altered during sepsis and the influence of septic plasma components over phagocytosis and chemotaxis remains to be determined. We sought to investigate the effects of the plasma from patients with sepsis over the phagocytic and chemotactic activities of neutrophil-like HL-60 cells, comparing these results with those observed with plasma from patients with noninfectious systemic inflammatory response (SIRS) and patients without SIRS. Plasma was obtained at the time of sepsis or SIRS diagnosis (day 1), and on days 2, 3, 5, 10, 20 and 28. Phagocytosis tests were performed by adding plasma to neutrophil-like HL-60 differentiated cells and fluorescent *E.coli*. The phagocytic index was measured by flow cytometry after 20' and 50' incubation. The chemotaxis tests were performed in response to fMLP and IL-8 by incubating plasma and differentiated HL-60 cells. Migrating cells were counted by using fluorometric microvolume assay technology. 66 patients were included, sepsis (n=30), non-infectious SIRS (n=24), and non-SIRS (n=11). The phagocytic activity of neutrophils at 20' and 50' measured at inclusion was significantly higher with plasma obtained from septic patients as compared to that observed when plasma from non-infectious SIRS and non-SIRS patients were used ($p=0.009$, $p=0.03$). This difference remained significant after 50' with the plasma obtained on days 2 and 5 ($p=0.02$, $p=0.001$, respectively). Considering only patients with SIRS (n=54), the phagocytic activity was significantly higher after 20 min in the septic group with plasma obtained at inclusion ($p=0.01$), with a trend to significance after 50' incubation ($p=0.06$). In the 12 septic patients alive at day 28, the phagocytosis activity increased during the follow up, and the difference between the phagocytic indexes measured at inclusion and on 28th day was significant for both incubation times ($p=0.04$ for both). The chemotactic activity of neutrophils in response to fMLP and IL-8 measured at inclusion was significantly decreased by septic plasma in comparison with non-infectious SIRS and non-SIRS groups ($p=0.007$, $p<0.0001$, respectively). Plasma from patients with sepsis decreased IL-8-dependent chemotactic activity more than that obtained in patients with SIRS, at the time of inclusion, on day 2, and on day 3 ($p=0.05$, $p=0.006$, $p=0.005$, respectively). In septic patients alive on day 28, the chemotactic response to IL-8 increased over the time, and the difference between the time of inclusion and the 28th day was significant ($p=0.001$). Remarkably, for all collecting points, there was no difference in IL-8 plasma levels between septic and non-infectious SIRS groups. Higher levels of bacterial phagocytosis and lower levels of chemotaxis to IL-8 were associated with increased 28-day mortality. Taking in account all studied patients, a significant correlation between phagocytic / chemotactic activities and severity (SAPS III and SOFA scores) was observed. All told, we can conclude that plasma from septic patients enhances the phagocytic activity and impairs the chemotaxis of neutrophil-like cells. The phagocytic function remains increasing during the follow-up of septic survivors while chemotactic activity progressively recovers along sepsis evolution, reaching supra normal levels at the end of follow-up. Opsonins and mediators present in septic plasma influencing innate response remain to be unraveled.

Key words: sepsis, neutrophils, plasma, phagocytosis, chemotaxis

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- UTI: Unidade de Terapia Intensiva
- EUA: Estados Unidos
- HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana
- APACHE II: *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*
- ILAS: Instituto Latino Americano de Sepse
- ACCP/SCCM: *American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee*
- SIRS: Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
- PaCO₂: pressão arterial de gás carbônico
- mmHg: milímetros de mercúrio
- mm³: milímetros cúbicos
- PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns*
- PRRs: *pattern recognition receptors*
- TLRs: *Toll-like receptors*
- LPS: lipopolissacáride
- G-CSF: fator de estimulação de colônia de granulócitos
- N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina: fMLP
- IL-8: interleucina 8
- ROS: espécies reativas de oxigênio
- TNF-α: fator de necrose tumoral alfa
- IL-1β: interleucina 1 beta
- CARS: *compensatory anti-inflammatory response syndrome*
- MHC: complexo maior de histocompatibilidade
- SARA: síndrome da angústia respiratória aguda
- PNM: polimorfonucleares
- CNF-1: fator necrotizante citotóxico-1
- IL-10: interleucina 10
- HRTN: Hospital “Risoleta Tolentino Neves
- mg/dia: miligramas por dia
- D01: dia 1

- D02: dia 2
- D03: dia 3
- D05: dia 5
- D10: dia 10
- D20: dia 20
- D28: dia 28
- mL: mililitro
- SAPS: *Simplified Acute Physiology Score*
- SOFA: *Sequential Organ Failure Assessment Score*
- L/min/m²: litro por minuto por metro ao quadrado
- PaO₂: pressão arterial de oxigênio
- FiO₂: fração inspirada de oxigênio
- mg/dL: miligramas por decilitro
- µL: microlitro
- mmol/L: milimol por litro
- VM: ventilação mecânica
- CONEP: Comitê Nacional de Pesquisa
- PGGH = penicilina G + gentamicina + L-glutamina + hepez
- DMSO: dimetilsulfóxido
- mM: milimolar
- SSC-H: *Side Scatter*
- FSC-H: *Forward Scatter*
- µm: micrômetros
- nM: nanomolar
- ng/mL: nanograma por mililitro
- UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
- COEP-UFMG: Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG
- TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1. Flowchart of study inclusion _____ 56
- Figure 2. Phagocytosis of *E.coli* by neutrophil-like HL-60 cells challenged by septic (n=31), non-infectious SIRS (n=24) and non SIRS (n=11) plasma sampled at study inclusion _____ 58
- Figure 3. Evolution of the phagocytosis of *E.coli* by neutrophil-like HL-60 cells during the follow up of the 12 septic patients who were alive on the 28th day (n=12) _____ 58
- Figure 4. Comparison of *E.coli* phagocytosis by neutrophil-like HL-60 cells between days 1 and 28 among septic patients who survived until the 28th day of follow up (n=12) _____ 58
- Figure 5. Chemotaxis activity of neutrophil-like HL-60 cells challenged by septic (n=31), noninfectious SIRS (n=24) and non SIRS (n=11) plasma sampled at study inclusion ____ 59
- Figure 6. Evolution of IL-8 dependent chemotaxis of neutrophil-like HL-60 cells during the follow up of the 12 septic patients who were alive on the 28th day (n=12) _____ 59
- Figure 7. Comparison of IL-8 dependent chemotaxis by neutrophil-like HL-60 cells between days 1 and 28 among septic patients who survived until the 28th day of follow up (n=12) _____ 59
- Figure 8. CXCR1 and CXCR1 expression on surfaces of neutrophil-like HL-60 cells and neutrophils from a healthy donor under the influence of septic (n=10), noninfectious SIRS (n=10) e non SIRS (n=10) plasma _____ 65
- Figure 9. Longitudinal evaluation of phagocytic index among noninfectious SIRS patients who developed nosocomial infection during the follow-up. Arrows indicate the diagnosis of nosocomial infection _____ 65

LISTA DE TABELAS

Table 1. Clinical and biological characteristics of the studied patients, according to the group of inclusion _____ 57

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Formulário individual para o registro das características clínica e laboratoriais _____ 76

Apêndice 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido / Paciente _____ 81

Apêndice 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido / Responsável _____ 84

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1.	EPIDEMIOLOGIA DA SEPSE	16
2.2.	SEPSE E SUAS DEFINIÇÕES.....	20
2.2.1.	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS).....	20
2.2.2.	Sepse.....	21
2.3.	IMUNIDADE INATA	22
2.3.1.	Fagocitose.....	22
2.3.1.1.	Reconhecimento e internalização.....	23
2.3.1.2.	Sinalização intracelular.....	24
2.3.1.3.	Fagocitose e inflamação.....	24
2.3.2.	QUIMIOTAXIA	25
2.3.2.1.	Mobilização	25
2.3.2.2.	Marginação e “rolling”	26
2.3.2.3.	Adesão	26
2.3.2.4.	Transmigração.....	26
2.4.	A IMUNOPATOGÊNESE DA SEPSE.....	27
2.4.1.	Resposta imune inata e sepse	29
3.	JUSTIFICATIVA	33
4.	OBJETIVOS.....	34
4.1.	OBJETIVO GERAL.....	34
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
5.	METODOLOGIA.....	35
5.1.	DESENHO DO ESTUDO	35
5.2.	LOCAIS DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA	35
5.3.	FASE CLÍNICA	35
5.3.1.	Sujeitos da pesquisa e grupos de estudo	35
5.3.1.1.	Critérios de inclusão.....	37
5.3.1.2.	Critérios de Exclusão	37
5.3.2.	Plano de coleta, processamento e armazenamento das amostras de plasma.....	38
5.3.3.	Seguimento clínico	38
5.3.3.1.	Definição de variáveis	39

5.4.	FASE EXPERIMENTAL	43
5.4.1.	Cultivo celular	43
5.4.2.	Preparação do plasma	44
5.4.3.	Testes de opsonofagocitose	44
5.4.4.	Testes de quimiotaxia.....	46
5.5.	CÁLCULO DA AMOSTRA.....	47
5.6.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	47
5.7.	PESQUISA BIBLIOGRÁFICA	48
5.8.	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	48
6.	ARTIGO.....	50
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
9.	APÊNDICES	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

1. INTRODUÇÃO

A resposta inflamatória sistêmica relacionada à presença de infecção é denominada sepse (ACCP/SCCM, 1992). A sepse e as disfunções orgânicas múltiplas a ela associadas são consideradas atualmente como a principal causa de morbidade e mortalidade nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) não-coronarianas (MARTIN *et al.*, 2003).

Múltiplos estudos epidemiológicos realizados em diferentes países demonstraram uma tendência unânime de elevação da incidência dos casos de sepse nas últimas décadas, com decréscimo insatisfatório das taxas de mortalidade que ainda permanecem inaceitavelmente elevadas (FRIEDMAN; SILVA; VINCENT, 1998; MARTIN *et al.*, 2003). Além do impacto social, a sepse determina também um relevante impacto econômico, acarretando uma despesa anual estimada em mais de 16 bilhões de dólares nos Estados Unidos (EUA) (ANGUS *et al.*, 2001).

A sepse pode então ser considerada como um dos principais desafios da medicina atual justificando os recursos massivos que são investidos no desenvolvimento e avaliação de novas terapias e os consideráveis esforços que tem sido feitos no sentido de se obter uma maior compreensão da resposta imuno-inflamatória e das disfunções orgânicas a ela associadas (ANGUS *et al.*, 2001).

Coerentemente a essas justificativas, o comportamento do sistema imune na sepse tornou-se tema de múltiplos estudos em todo o mundo e foco primário de importantes discussões. Algumas evidências relacionadas ao desajuste das funções da resposta imune inata em pacientes sépticos, envolvendo funções de quimiotaxia, opsonização, fagocitose, “degranulação” e “killing”, já foram demonstradas (PUGIN, 2006). Entretanto, os resultados apresentados pelos diferentes estudos são conflitantes e a heterogeneidade dos métodos experimentais e das populações estudadas poderiam representar explicações parciais para tal discrepância. A imensa maioria dos estudos conduzidos nesse campo avaliou a atividade dos leucócitos a partir da utilização de células isoladas dos próprios pacientes sépticos, coletadas no momento de diagnóstico dessa condição. Nenhum desses trabalhos avaliou os efeitos que o plasma de pacientes sépticos pode exercer, isoladamente, sobre as funções da imunidade inata mediadas por neutrófilos humanos supostamente normais. Além disso, tais efeitos nunca foram avaliados de maneira prospectiva, ou seja, desde o diagnóstico até a resolução do quadro infeccioso.

Diante do exposto, o presente estudo tem o objetivo de avaliar, de maneira prospectiva, as influências exercidas pelo plasma séptico sobre funções da imunidade inata mediadas por neutrófilos humanos considerados normais, comparando-as com outros dois grupos de pacientes críticos compostos por pacientes com SIRS de origem não-infecciosa e por pacientes sem critérios de SIRS. Encontra-se, portanto, inserido no relevante contexto de busca a um maior entendimento dos processos imuno-inflamatórios relacionados à sepse.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. EPIDEMIOLOGIA DA SEPSE

A sepse e as condições clínicas a ela associadas representam área de grande interesse e importância na medicina. De acordo com dados internacionais, a sepse grave e as disfunções orgânicas múltiplas a ela associadas são consideradas atualmente como a principal causa de morbidade e mortalidade nas UTI não-coronarianas (MARTIN *et al.*, 2003). Estima-se que, nos EUA, essa condição seja responsável por cerca de 10% das mortes anuais, equiparando à mortalidade associada ao infarto agudo do miocárdio (ANGUS *et al.*, 2001).

Diferentes estudos tem demonstrado o aumento da incidência dos casos de sepse ao longo do tempo e múltiplos fatores têm contribuído ativamente para essa realidade. Em relação aos aspectos populacionais, torna-se evidente o aumento proporcional de indivíduos imunossuprimidos por causas diversas, seja pelo advento da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), seja pelo uso disseminado de terapias imunossupressoras. Os indiscutíveis avanços implementados na medicina e evidenciados pela melhoria dos cuidados à população idosa e debilitada, associados aos melhores resultados obtidos com cirurgias de transplante de órgãos e ao uso disseminado de procedimentos e dispositivos invasivos, como cateteres intravasculares, drenos torácicos, tubos endotraqueais e diferentes próteses, justificam a incidência crescente dos casos de sepse grave e choque séptico (FRIEDMAN; SILVA; VINCENT, 1998; ANGUS *et al.*, 2001). Outro motivo plausível para justificar o aumento acelerado na incidência de sepse refere-se ao fato de que, como essa entidade tem se tornado cada vez mais familiar e reconhecível na prática clínica, os registros médicos relativos a essa condição tornaram-se mais frequentes ao longo dos anos (MARTIN *et al.*, 2003). No estudo de Angus e colaboradores, realizado a partir da análise dos registros de alta hospitalar dos hospitais não-federais dos EUA no ano de 1995, os autores projetaram um acréscimo na incidência dos casos de sepse grave de 1,5% ao ano (ANGUS *et al.*, 2001). Já o estudo desenvolvido posteriormente no mesmo país, a partir da avaliação de todas as internações hospitalares no período de 1979 a 2000, revelou um surpreendente aumento anual de 8,7% nas taxas de incidência durante o intervalo de tempo considerado (MARTIN *et al.*, 2003). Dois importantes estudos franceses também avaliaram a dinâmica da incidência de sepse em hospitais daquele país. O primeiro, realizado a partir da análise dos dados coletados de 22 hospitais durante o período de 1993 a 2000, revelou um aumento da incidência de choque séptico nas admissões em UTI de 7% para 9,7% (ANANNE *et al.*, 2003). O segundo, um estudo de coorte conduzido em 206 UTI francesas

durante o período de duas semanas em 2001, demonstrou um aumento global de 75% da incidência de sepse grave nas internações realizadas nesse setor, quando comparado aos dados obtidos pelo mesmo grupo no ano de 1993 (BRUN-BUISSON *et al.*, 1995; BRUN-BUISSON *et al.*, 2004).

A despeito do evidente aumento das taxas de incidência de sepse e dos avanços científicos e técnicos inegáveis da medicina, a mortalidade associada a essa condição não tem reduzido de maneira satisfatória e ainda atinge índices inaceitáveis (FRIEDMAN; SILVA; VINCENT, 1998; MARTIN *et al.*, 2003). Tal afirmação é comprovada pela análise desenvolvida a partir da avaliação de todos os estudos científicos que contemplaram os índices de mortalidade secundária ao choque séptico desde 1958 a 1997. Os autores observaram que a mortalidade geral associada a esta entidade nos diferentes estudos foi de 49,7% e que as taxas, apesar de terem decrescido ao longo do período analisado, não o fizeram da maneira esperada, já que a compreensão acerca da patogênese da sepse e os recursos terapêuticos e diagnósticos disponíveis evoluíram significativamente ao longo dos anos. Curioso notar que uma das prováveis justificativas que poderia mascarar os efeitos dos progressos científicos nas taxas de mortalidade associadas à sepse diz respeito justamente às modificações do perfil demográfico dos pacientes sujeitos a essa condição: os avanços nas cirurgias de transplante de órgãos e nas cirurgias cardíacas de alto risco, a disseminação de terapias imunossupressoras e a melhoria da assistência aos pacientes idosos ou portadores de múltiplas patologias tem determinado um acréscimo substancial da população sujeita às instâncias mais graves da sepse que, no passado, não sobreviveriam às suas condições clínicas de base (FRIEDMAN; SILVA; VINCENT, 1998).

Na América Latina, os dados epidemiológicos associados à sepse ainda são escassos (SILVA *et al.*, 2004). O Brasil, entretanto, destaca-se na condução de estudos que visam esclarecer e minimizar as repercussões da sepse dentro do nosso contexto sócio-econômico e de prestação de serviços de saúde à população geral.

Por ser um país de dimensões continentais e de grande heterogeneidade populacional, no que diz respeito às características sócio-econômicas e ao acesso aos serviços de saúde, a elaboração de conclusões epidemiológicas sólidas relativas às repercussões da sepse no Brasil constitui-se em grande desafio (SILVA *et al.*, 2004).

O primeiro estudo epidemiológico prospectivo realizado nesse contexto no Brasil foi desenvolvido a partir das análises de todas as internações em UTI mistas de cinco hospitais de dois Estados do país (São Paulo e Santa Catarina) no período de maio de 2001 a janeiro de 2002.

Dentre os hospitais avaliados, apenas um pertence à iniciativa privada. Os pacientes foram avaliados durante os 28 dias consecutivos à admissão na UTI, ou até o óbito ou alta da unidade. A mediana da idade dos pacientes que apresentaram sepse em seus diferentes níveis de gravidade durante o período de acompanhamento foi de 65 anos com maior prevalência entre os indivíduos do sexo masculino, à semelhança dos dados publicados pelos países desenvolvidos. A taxa de mortalidade geral associada à sepse nos 28 dias de seguimento foi de 21,8%, atingindo 52,2% quando considerados apenas os casos de choque séptico. Indispensável pontuar que as taxas de incidência de sepse grave e choque séptico foram significativamente maiores quando comparadas às internações nos hospitais privado e públicos (15,3% vs. 35% e 11,7% vs. 30,7%, respectivamente). As taxas de mortalidade relacionadas à sepse grave e ao choque séptico também foram marcadamente superiores entre os pacientes internados nos hospitais públicos (32,7% vs. 51,6% e 33,3 vs. 57,1%), sendo que o *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II* (APACHE II) da admissão dos pacientes não variou de modo significativo entre os dois grupos. O principal sítio infeccioso evidenciado nos casos de sepse de todas as UTI envolvidas foi o trato respiratório inferior (SILVA *et al.*, 2004).

Um segundo estudo de coorte foi realizado em um número maior de UTI públicas e privadas de todas as regiões do Brasil a partir da análise das internações ocorridas em setembro de 2003. Os pacientes foram também acompanhados por 28 dias ou até o óbito ou alta da unidade. Corroborando os dados encontrados no estudo anterior, a idade média dos pacientes avaliados foi de 62 anos, com predomínio da população masculina. A incidência de sepse em seus diferentes níveis de gravidade foi de 16,7%, semelhante às relatadas pelos estudos internacionais, porém a mortalidade geral em 28 dias foi surpreendentemente alta: 46,6% dos indivíduos admitidos com sepse ou que desenvolveram sepse faleceram durante o período observado. Tal taxa assumiu um espantoso valor de 65,3% quando avaliados apenas os casos de choque séptico. A mortalidade geral foi um pouco superior nos hospitais públicos (48,1%) quando comparada aos serviços privados (45,6%), mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. Em relação à microbiologia, houve grande diferença em relação aos dados publicados pelos países desenvolvidos: enquanto tais estudos apontam unanimemente as bactérias gram-positivo como principais microorganismos responsáveis pelos casos de sepse (FRIEDMAN; SILVA; VINCENT, 1998; MARTIN *et al.*, 2003; BRUN-BUISSON *et al.*, 2004), os dados brasileiros identificaram os bacilos gram-negativo, em especial a *Pseudomonas aeruginosa*, como os agentes causais preponderantes (40,1% dos casos) (SALES JÚNIOR *et al.*, 2006).

O estudo COSTS, conduzido pelo Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS) em 2007, avaliou os custos relacionados ao atendimento de 524 pacientes com sepse, sepse grave e choque séptico em 21 UTI brasileiras. Foi demonstrado que a mediana de custos diários por paciente foi igual a 1.028,00 dólares, determinando um gasto global por doente, durante toda a permanência na UTI, igual a 10.595,00 dólares (SOGAYAR *et al.*, 2008).

A análise dos resultados dos principais estudos brasileiros relacionados à epidemiologia da sepse, à exceção dos dados referentes ao hospital privado analisado no primeiro estudo (SILVA *et al.*, 2004), colocam nosso país como uma das nações mundiais com maior mortalidade associada ao choque séptico. Uma das possíveis explicações para esse fato pode se relacionar ao atraso das admissões dos pacientes sépticos nas UTI, o que determina um aumento na proporção dos pacientes transferidos já com o diagnóstico de sepse grave ou choque séptico e com escores de gravidade na admissão significativamente elevados (SALES JÚNIOR *et al.*, 2006).

Com o intuito de modificar o panorama epidemiológico relacionado à sepse, um comitê internacional vem desenvolvendo, desde 2002, uma campanha mundial de implementação de diretrizes baseadas nas melhores evidências científicas disponíveis, as quais tem como objetivo a redução da mortalidade associada à sepse grave (DELLINGER *et al.*, 2004; DELLINGER *et al.*, 2008). Esse movimento é conhecido como “*Surviving Sepsis Campaign*” e, no Brasil, é conduzido pelo ILAS desde 2004 (TELES *et al.*, 2008). Mesmo que o objetivo de redução de 25% do risco de morte associado à sepse grave não tenha sido completamente atingido nos cinco primeiros anos de implementação da campanha no Brasil, o trabalho de orientação conduzido pelo instituto resultou em queda significativa da mortalidade nas instituições participantes e não é claro se essa redução é advinda apenas da adesão às metas orientadas ou se também apresenta relação ao processo educacional envolvido na campanha (MACHADO; MAZZA, 2010).

Uma análise geral dos dados apresentados anteriormente permite-nos concluir que grandes estudos epidemiológicos já foram realizados na tentativa de estabelecerem, nas diferentes populações, as taxas de incidência de sepse em seus diferentes níveis de gravidade, a morbidade e a mortalidade a ela associadas, os fatores prognósticos e os custos agregados a essa condição. Embora apresentem diferenças no que diz respeito ao desenho proposto e, em algumas vezes, aos distintos resultados encontrados, todos são unânimes ao apontar uma direção única: a sepse representa um dos principais desafios da medicina moderna, justificando os massivos recursos que são investidos no tratamento desses pacientes e na busca de novas terapias potenciais, além dos grandes esforços científicos objetivando um maior entendimento das características imuno-inflamatórias envolvidas nesse processo (ANGUS *et al.*, 2001).

2.2. SEPSE E SUAS DEFINIÇÕES

Na tentativa de padronizar as definições clínicas aplicáveis aos pacientes com sepse e suas complicações, o *American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SCCM) reuniu-se em 1991 para estabelecer novas definições pertinentes e descartar conceitos antigos que causavam confusão e dificuldade na interpretação dos dados (ACCP/SCCM, 1992).

Os conceitos criados nessa situação foram largamente aceitos e difundiram-se nos diferentes ambientes clínicos e científicos, possibilitando a padronização de protocolos de pesquisa e a disseminação de informações derivadas de estudos clínicos. Os termos adquiriram caráter amplo, com grande sensibilidade para a detecção precoce e à beira do leito da possibilidade de ocorrência de sepse, o que viabilizou a instituição de intervenções terapêuticas mais precoces e eficazes. Por outro lado, como veremos a seguir, os conceitos são muito simplificados e poucos específicos para descrever relações potencialmente muito complexas (VINCENT, 1997).

2.2.1. SÍNDROME DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA (SIRS)

De acordo com a ACCP/SCCM, esse termo descreve o processo inflamatório gerado em resposta à injúria orgânica determinada por estímulos de diferentes naturezas, incluindo os insultos infecciosos (ACCP/SCCM, 1992).

Caracteriza-se pela presença de pelos menos dois dos seguintes critérios clínicos:

- Temperatura corporal $> 38^{\circ} \text{C}$ ou $< 36^{\circ} \text{C}$
- Frequência cardíaca > 90 batimentos/minuto
- Frequência respiratória > 20 incursões/minuto ou Pressão arterial de gás carbônico (PaCO_2) < 32 mmHg
- Global de leucócitos > 12.000 células/ mm^3 ou < 4.000 células/ mm^3 ou mais de 10% de formas imaturas circulantes

Para que sejam consideradas SIRS, tais alterações devem representar modificações agudas da condição clínica de base do paciente, na ausência de outras causas que possam justificar tais anormalidades (ACCP/SCCM, 1992).

Como pontuado por Vincent e notado amplamente na prática clínica e científica, na tentativa de se estabelecer critérios altamente sensíveis para a detecção de SIRS, foi elaborado um conceito muito pouco específico e que não ajuda na compreensão dos fenômenos patofisiológicos relacionados aos estados de doença. Pouco tempo após a introdução dessa nova denominação, tornou-se evidente que os critérios definidores de SIRS podem ser preenchidos por mais de dois terços dos pacientes internados em UTI e por uma proporção substancial de pacientes internados em outros setores do hospital. Denunciando ainda mais a falta de especificidade de tal conceito, nota-se que, até mesmo indivíduos considerados saudáveis, preenchem regularmente os critérios de SIRS ao praticarem atividade física, pois apresentam taquicardia e taquipnéia nestas situações (VINCENT, 1997).

Outra crítica pertinente ao conceito de SIRS refere-se ao fato de que os critérios utilizados para a sua definição não se correlacionam à gravidade da resposta inflamatória, ou seja, o fato de pacientes preencherem um maior número de critérios estabelecidos não está associado a um pior prognóstico ou a um maior índice de mortalidade (MUCKART; BHAGWANJEE, 1997).

2.2.2. SEPSE

A sepse é definida como a ocorrência de SIRS em resposta a um insulto infeccioso (ACCP/SCCM, 1992). Seus estágios clínicos reconhecíveis, diretamente relacionados ao prognóstico, podem ser definidos da seguinte maneira (ACCP/SCCM, 1992):

- Sepse: representa a resposta sistêmica gerada pela ocorrência de uma infecção
- Sepse grave: é definida como sepse associada à presença de pelo menos uma disfunção orgânica, hipoperfusão ou hipotensão. As anormalidades de perfusão incluem a presença de acidose láctica, oligúria ou alteração súbita do nível de consciência
- Choque séptico: é considerado como uma instância da sepse grave que, além da presença de disfunção orgânica, caracteriza-se pela ocorrência de hipotensão refratária à reposição volêmica. Os pacientes recebendo suporte inotrópico e/ou vasopressor podem não estar hipotensos no momento em que as anormalidades de perfusão são avaliadas

Apesar de todas as críticas pertinentes aos conceitos estabelecidos pela ACCP/SCCM, eles possuem seus méritos inquestionáveis e serão utilizados neste trabalho como definidores dos casos de sepse e seu espectro de gravidade.

2.3. IMUNIDADE INATA

Há cerca de cem anos, Ehrlich e Metchnikoff descreveram dois mecanismos diferentes pelos quais o hospedeiro é capaz de se defender das infecções. As antitoxinas, encontradas apenas em vertebrados e posteriormente denominadas anticorpos, foram identificadas por Ehrlich e conferem um tipo de proteção denominada imunidade adaptativa. As células fagocitárias descobertas por Metchnikoff constituem a “pedra angular” da resposta imune inata e foram identificadas originalmente em equinodermas, embora estejam presentes em quase todos os organismos do reino animal. Filogeneticamente, a resposta imune inata precede a resposta adaptativa e, isoladamente, confere proteção para a maioria das espécies animais existentes no planeta (BEUTLER; POLTORAK, 2001). Entretanto, quando coexistentes no indivíduo, a resposta contra microorganismos invasores desenvolve-se a partir da interação desses dois braços da imunidade (LIEN; INGALLS, 2002).

A resposta inata constitui a primeira linha de defesa contra as doenças infecciosas e é amplamente mediada por células da série branca, como neutrófilos e macrófagos. Tais células são capazes de fagocitar e eliminar o patógeno além de coordenar a resposta imune adicional desenvolvida pelo hospedeiro contra o microorganismo invasor (ADEREM, 2001). As interfaces entre as respostas inata e adaptativa do sistema imune são geradas quando os anticorpos, ao opsonizarem os patógenos, tornam-os suscetíveis à fagocitose pelas células do sistema imune inato e quando as células do sistema inato, após englobarem e destruírem o patógeno no interior dos fagossomos, apresentam seus peptídeos a receptores das células T, ativando-as. Essa ativação culmina na produção de anticorpos altamente específicos contra o microorganismo invasor (BEUTLER; POLTORAK, 2001; ADEREM, 2003). A produção dos componentes humorais da resposta adaptativa confere imunidade protetora ao hospedeiro, ao passo que essa memória imunológica não é conferida pelos mecanismos de defesa da resposta inata (ADEREM, 2001).

2.3.1. FAGOCITOSE

A fagocitose representa um antigo mecanismo de adaptação celular. Em organismos primitivos, ela é utilizada primariamente para a aquisição de nutrientes, enquanto que, em organismos superiores, ela é desempenhada por células especializadas (ex. macrófagos, neutrófilos e células dendríticas), tornando-se indispensável na realização de uma grande variedade de eventos biológicos especializados (ADEREM, 2003).

A fagocitose é um mecanismo de defesa essencial da resposta imune inata. O contato da célula fagocitária com o microorganismo é acompanhado de sinais que ativam processos celulares tais como rearranjo do citoesqueleto com tráfego da membrana citoplasmática, ativação de mecanismos microbicidas, produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, ativação de apoptose celular e mecanismos de apresentação de antígenos para as células do sistema imune adaptativo (UNDERHILL; OZINSKY, 2002).

Apesar da complexidade de mecanismos de reconhecimento das partículas e sinalizações intracelulares, pode-se subdividir o processo de fagocitose em três etapas cruciais: (1) reconhecimento e internalização; (2) sinalização intracelular e; (3) acoplamento da atividade fagocitária à resposta inflamatória local e sistêmica (UNDERHILL; OZINSKY, 2002).

2.3.1.1. RECONHECIMENTO E INTERNALIZAÇÃO

Os processos de reconhecimento e internalização das diferentes partículas microbianas ocorrem através de uma grande variedade de mecanismos moleculares e morfológicos. As partículas invasoras podem ser reconhecidas tanto através de sua ligação direta aos receptores, quanto através da ligação de opsoninas em sua superfície aos receptores localizados na membrana das células fagocitárias (UNDERHILL; OZINSKY, 2002).

O mesmo patógeno pode ser reconhecido simultaneamente por diferentes receptores (UNDERHILL; OZINSKY, 2002), mas para que a fagocitose desenvolva-se de maneira efetiva, é de fundamental importância que as células efetoras tenham a capacidade de diferenciar entre os componentes do patógeno e os componentes do *self*, utilizando apenas uma quantidade limitada de receptores. Esse desafio assume maiores proporções pela sabida habilidade que os microorganismos têm de sofrerem mutações, mas se atenua pela existência de uma série de receptores que são capazes de reconhecer regiões conservadas dos patógenos que não são encontradas em organismos eucariotas superiores (ADEREM, 2001).

Essas regiões conservadas dos patógenos foram denominadas por Janeway e colaboradores de "*pathogen-associated molecular patterns*" (PAMPs) e os receptores celulares capazes de reconhecerem e se ligarem aos PAMPs foram chamados de "*pattern recognition receptors*" (PRRs) (JANEWAY; MEDZHITOV, 1998). Os PAMPs desempenham funções essenciais na dinâmica biológica dos patógenos e não estão sujeitos a altos índices de mutações (ADEREM, 2001), já que mutações nesses padrões determinariam um não-reconhecimento pelas células do sistema imune (BEUTLER; POLTORAK, 2001). Uma grande variedade de PAMPs já foi identificada e inclui

diferentes componentes da parede celular de bactérias, como o lipopolissacáride (LPS), lipopeptídios, peptidoglicanos e ácidos lipotécóicos, fragmentos de DNA das bactérias e lipoarabinomanans da parede celular de leveduras (ADEREM, 1999; BEUTLER; POLTORAK; 2001; LIEN; INGALLS, 2002; ADEREM, 2003).

Após o reconhecimento e ligação das partículas invasoras aos receptores das células fagocitárias, sinais que induzem a polimerização de moléculas de actina sob a membrana no local de contato são gerados e a membrana citoplasmática estende-se em torno da partícula direcionando-a ao centro da célula. O fagossomo transforma-se em fagolisossomo através de uma série de eventos de fusão de membranas e, em seu interior ácido e hidrolítico, o patógeno é morto e digerido em preparação para o processo de apresentação de antígenos (ADEREM, 2003).

2.3.1.2. SINALIZAÇÃO INTRACELULAR

Enquanto alguns dos receptores da superfície celular participam apenas da ligação do microorganismo à célula, facilitando sua internalização, outros são capazes de transmitir sinais intracelulares que atuam nos mecanismos de resposta inflamatória (UNDERHILL; OZINSKY, 2002), participando de eventos que levam à transcrição genética e à secreção de proteínas, a alterações na morfologia celular e ativação de mecanismos microbicidas (ADEREM, 2003).

O processo de internalização é acompanhado de múltiplos mecanismos de sinalização que coordenam os rearranjos do citoesqueleto, a extensão da membrana citoplasmática e o envolvimento da partícula. Centenas de moléculas sinalizadoras incluindo proteínas ligadoras de actina, reguladores do tráfego da membrana plasmática, canais iônicos, diferentes cinases e lipases são ativadas durante a fagocitose, contribuindo para a internalização eficaz do patógeno e para a regulação da resposta inflamatória (UNDERHILL; OZINSKY, 2002).

2.3.1.3. FAGOCITOSE E INFLAMAÇÃO

A internalização de partículas microbianas pelas células fagocitárias é geralmente acompanhada de sinalização inflamatória e ativação de mecanismos microbicidas. Alguns receptores, como os da porção Fc das imunoglobulinas, são capazes de ativar diretamente uma resposta pró-inflamatória, mas existe uma série de receptores adicionais que não necessariamente participam do processo de internalização, mas são capazes de regular a fagocitose, acoplando-a à resposta inflamatória (UNDERHILL; OZINSKY, 2002). Dentro dessa categoria de receptores, destacam-se os *Toll-like receptors* (TLRs), que são recrutados para o

interior dos fagossomos, sendo capazes de analisar seu conteúdo e determinar a natureza do patógeno endocitado (ADEREM, 2001).

Os TLRs constituem parte crucial da resposta imune inata, funcionando como receptores (PRRs) que reconhecem as regiões conservadas dos patógenos (PAMPs). Seus membros são proteínas transmembrana que apresentam homologia de domínio intracelular com os receptores de IL-1 (ADEREM, 2003) e uma resposta pró-inflamatória, caracterizada pela produção de citocinas, destruição e remodelamento tissular, é evocada pela ativação dos TLRs em mamíferos (BEUTLER; POLTORACK, 2001).

Dez diferentes membros da família de TLRs já foram identificados no genoma humano (LIEN; INGALLS, 2002). Diferentes TLRs reconhecem diferentes PAMPs, mas uma multiplicidade de PAMPs pode ser reconhecida por combinações diversas de TLRs, sugerindo que tais receptores podem estabelecer entre si um amplo repertório de associações possíveis a fim de discriminar os variados PAMPs encontrados na natureza (ADEREM, 2001).

Os TLRs são capazes de ler o “código de barras” do microorganismo invasor, funcionando como pontos cruciais da conexão entre a fagocitose e a resposta inflamatória específica gerada contra tal patógeno (ADEREM, 2003). Os sinais criados pela interação dos TLRs com diferentes PAMPs, ao direcionarem os mecanismos de inflamação, atuam como orientadores da resposta imune inata às infecções (LIEN; INGALLS, 2002).

2.3.2. QUIMIOTAXIA

O recrutamento dos leucócitos para os locais de ocorrência de insulto inflamatório e/ou infeccioso é um dos mecanismos cruciais da resposta imune inata (REDDY; STANDIFORD, 2010). A migração das células de defesa do compartimento intravascular para o extravascular ocorre predominantemente nas vênulas pós-capilares, sendo mediada por uma combinação de processos químicos, mecânicos e moleculares (ALVES-FILHO *et al.*, 2008). Pode ser didaticamente dividida em quatro etapas: (1) mobilização; (2) marginação e “rolling”; (3) adesão e; (4) transmigração (REDDY; STANDIFORD, 2010).

2.3.2.1. MOBILIZAÇÃO

O fator de estimulação de colônia de granulócitos (G-CSF) influencia, sob condições clínicas habituais, a liberação de granulócitos maduros pela medula óssea (FURZE; RANKIN, 2008). Sob condições inflamatórias e/ou infecciosas, citocinas pró-inflamatórias estimulam ainda mais a

liberação de granulócitos mediada pelo G-CSF, aumentando o número e a proporção de granulócitos circulantes. Na ausência de inflamação, os neutrófilos circulam por um curto período de tempo (aproximadamente 6 horas) até serem destruídos no fígado, baço ou medula óssea (FURZE; RANKIN, 2008). Nas situações de inflamação, a meia-vida dos neutrófilos que migram para os sítios de insulto é prolongada por mediadores inflamatórios locais, como quimiocinas e outras moléculas capazes de direcionar a migração dessas células (HOFMAN, 2004).

2.3.2.2. MARGINAÇÃO E “ROLLING”

O movimento dos leucócitos em direção à periferia do vaso (marginação) permite uma interação de baixa afinidade entre tais células e o endotélio vascular (“rolling”). As principais moléculas efetoras dessas interações são chamadas de L-selectinas, expressas na superfície dos leucócitos circulantes, e de E-selectinas e P-selectinas, expressas na superfície endotelial após a ativação por quimiocinas e outros mediadores inflamatórios (MULLER, 2003).

2.3.2.3. ADESÃO

O fenômeno da adesão, caracterizado por interações de alta afinidade entre os neutrófilos e o endotélio, é induzido a partir do contato de baixa-afinidade entre tais células (“rolling”) e da ativação de quimiocinas. As principais moléculas de adesão na superfície dos neutrófilos (integrinas) interagem com as moléculas de adesão expressas pelas células endoteliais (ICAM-1 e VCAM-2) a fim de garantir uma ligação firme entre elas (REDDY; STANDIFORD, 2010).

2.3.2.4. TRANSMIGRAÇÃO

A etapa final do recrutamento dos leucócitos consiste na passagem dessas células através de junções estreitas no endotélio vascular em direção aos tecidos infectados. O processo de transmigração é guiado por gradientes de substâncias específicas capazes de induzir a migração celular. Tais substâncias podem ser componentes dos microorganismos (*N*-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina – fMLP), moléculas do próprio hospedeiro (componentes do complemento, eicosanóides, fator de ativação plaquetária) e quimiocinas. Essas substâncias servem não só para direcionar os leucócitos para determinadas regiões, como também para recrutar subpopulações específicas de leucócitos para o tecido inflamado (MULLER, 2003). A maior parte das moléculas que direcionam a migração leucocitária atua através da ligação a receptores acoplados à proteína G e é essa ligação que permite ao hospedeiro direcionar subpopulações leucocitárias específicas para as áreas de inflamação (KATANAEV, 2001). Substâncias como fMLP, leucotrieno B₄, fração 5a

do complemento e o fator de ativação plaquetária são inespecíficos para o recrutamento leucocitário, enquanto que a interleucina 8 (IL-8) atrai principalmente as populações de neutrófilos para os tecidos inflamados (BOKOCH,1995).

A IL-8, uma citocina pró-inflamatória potente, apresenta um papel crucial no recrutamento e ativação dos neutrófilos durante a inflamação. Tal citocina é capaz de atuar sobre os neutrófilos estimulando a quimiotaxia, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a degranulação e a adesão às células endoteliais (HAMMOND *et al.*, 1995). A IL-8 interage com os neutrófilos a partir da ligação a dois receptores diferentes: o CXCR1, ao qual se liga preferencialmente, e o CXCR2 que interage também com proteínas GRO, proteína inflamatória de macrófago 2 e peptídeo de ativação de neutrófilo 2. Essas informações indicam que a quimiotaxia dependente de IL-8 é mediada principalmente pelo CXCR1 e que tal receptor pode ser um alvo estratégico potencial para o tratamento de condições clínicas associadas ao influxo acentuado de neutrófilos para determinadas regiões do organismo (HAMMOND *et al.*, 1995).

2.4. A IMUNOPATOGÊNESE DA SEPSE

A sepsé descreve uma síndrome clínica complexa que se desenvolve quando a resposta inicial e apropriada do hospedeiro à infecção torna-se exacerbada e desregulada (COHEN, 2002; CARRIGAN, SCOTT, TABRIZIAN, 2004).

Inicialmente, acreditava-se que a sepsé e as disfunções orgânicas a ela associadas eram determinadas por uma exacerbação pró-inflamatória e hiperimune dos mecanismos de defesa, os quais eram induzidos por produtos bacterianos como o lipopolissacáride (LPS, endotoxina) e mediados por citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 1 beta (IL-1 β) (PUGIN, 2006). Muitos modelos de sepsé utilizando animais e voluntários sadios reforçavam esta teoria, já que a administração parenteral de LPS nestes indivíduos associava-se a uma elevação intensa dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, o que poderia precipitar as falências orgânicas da sepsé grave, já que tais citocinas possuem variados efeitos citotóxicos (SAKAGUSHI; SAKAGUSHI, 1979; MICHIE *et al.*, 1988). Tais experimentos serviram como base para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas anti-inflamatórias, baseadas na utilização de inibidores de TNF- α , IL-1 β (PUGIN, 2006). Entretanto, inúmeros ensaios multicêntricos falharam em demonstrar benefícios clínicos com a utilização de bloqueadores de citocinas e alguns deles demonstraram, inclusive, piores desfechos em algumas populações de pacientes sépticos que utilizaram bloqueadores de TNF- α (ABRAHAM, 1999). A inibição de componentes específicos da cascata inflamatória demonstrou ser possivelmente benéfica apenas

para o grupo de pacientes com sepse grave que receberam dotrecogina α ativada (proteína C ativada recombinante), uma proteína que inibe a trombose e a inflamação associadas à sepse (BERNARD *et al.*, 2001). Em relação às terapias anti-inflamatórias não específicas, a administração de esteróides em baixas doses demonstrou apresentar benefício, sem aumento de efeitos adversos, no grupo de pacientes com choque séptico e insuficiência adrenal relativa (ANNANE *et al.*, 2002).

Os resultados negativos obtidos com a maior parte dos estudos que analisaram os efeitos da utilização de inibidores específicos da cascata inflamatória fizeram com que o conceito patofisiológico exclusivamente pró-inflamatório da sepse fosse reavaliado (PUGIN, 2006). Estudos realizados posteriormente demonstraram que os pacientes sépticos apresentam, além dos mediadores pró-inflamatórios, inibidores naturais de citocinas (*eg.* antagonistas do receptor de IL-1), caracterizando a ocorrência de uma resposta anti-inflamatória concomitante (GOLDIE *et al.*, 1995).

Esta resposta anti-inflamatória observada na sepse é denominada de “*compensatory anti-inflammatory response syndrome*” (CARS). A CARS pode induzir um estado de imunossupressão que inicia-se precocemente a partir da instalação do processo infeccioso e há várias evidências demonstrando que os pacientes com sepse grave e choque séptico podem, na verdade, apresentar-se mais imunossuprimidos do que estimulados e que a ativação dos mecanismos pró-inflamatórios poderia ser, nestes casos, até mesmo benéfica (MUNFORD; PUGIN, 2001). Algumas evidências do estado de imunossupressão adquirido por pacientes sépticos são: (1) um número significativo de pacientes com sepse reativam infecções por vírus latentes, como o citomegalovírus (KUTZA *et al.*, 1998); (2) órgãos linfóides de doentes sépticos gravemente enfermos demonstram um sensível decréscimo da concentração de linfócitos e células dendríticas, em virtude do fenômeno de apoptose celular induzido pela sepse (HOTCHKISS, 1999; HOTCHKISS; KARL, 2003); (3) monócitos circulantes de pacientes sépticos demonstram um importante decréscimo na expressão de proteínas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), como o HLA-DR (FUMEAUX, PUGIN, 2002); (4) fagócitos de pacientes com sepse são deficientes na produção de TNF- α , IL-1 β quando estimulados por bactérias ou seus produtos, fenômeno conhecido como “paralisia imune” (VOLK; REINKE; DOCKE, 2000).

Tornado esta relação ainda mais complexa, noções de compartimentalização da resposta imune na sepse foram surgindo com o maior entendimento dos mecanismos de defesa envolvidos neste processo. Estudando os mecanismos inflamatórios relacionados à Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA) secundária à sepse, Pugin e colaboradores observaram que,

enquanto uma resposta fortemente pró-inflamatória era observada no compartimento alveolar, o compartimento circulatório apresentava-se, no mesmo momento, profundamente anti-inflamatório (PUGIN *et al.*, 1996; PUGIN *et al.*, 1999).

Atualmente, mesmo não estando completamente compreendidos os mecanismos de alteração da resposta imune durante a sepse, sabe-se que esta condição é resultante da interação de mecanismos antagônicos, sendo o produto de um desequilíbrio da regulação entre a resposta pró-inflamatória sistêmica e a resposta anti-inflamatória compensatória (CARRIGAN, SCOTT, TABRIZIAN, 2004).

2.4.1. RESPOSTA IMUNE INATA E SEPSE

Muitos dos componentes da resposta imune inata que estão normalmente envolvidos nos mecanismos de defesa do organismo contra os patógenos podem, a partir de uma resposta inflamatória desequilibrada, causar danos celulares e teciduais, levando às disfunções orgânicas secundárias à sepse (COHEN, 2002). Algumas evidências relacionadas ao desajuste das funções da resposta imune inata em pacientes sépticos, envolvendo funções de quimiotaxia, opsonização, fagocitose, “degranulação” e “killing”, já foram demonstradas em diferentes estudos (PUGIN, 2006). Entretanto, os resultados descritos são conflitantes entre si e a utilização de diferentes estímulos, bem como de métodos experimentais diversos, pode representar uma explicação parcial para resultados tão discrepantes (TANEJA *et al.*, 2008).

Em experimentos iniciais realizados na década de 70, Territo e Golde demonstraram que a administração parenteral de endotoxina (LPS) em quatro voluntários saudáveis não alterou a capacidade fagocitária dos neutrófilos destes indivíduos quando estimulados por *Candida albicans*, ao passo que, uma redução significativa da atividade quimiotática destas células foi observada após a administração de LPS (TERRITO; GOLDE, 1976).

Um estudo bastante interessante conduzido por Eisenfeld e colaboradores demonstrou que a transfusão de plasma fresco a recém-nascidos com sepse grave foi capaz de aumentar significativamente a capacidade quimiotática dos neutrófilos, indicando que transfusões de plasma fresco a pacientes sépticos pode recuperar parcialmente a motilidade suprimida de PMN e melhorar, potencialmente, o prognóstico de tal condição (EISENFELD *et al.*, 1992).

Com o objetivo de analisarem os níveis de ativação e a capacidade microbicida de leucócitos polimorfonucleares (PMN) em situações de resposta inflamatória sistêmica, Simms e D’Amico

conduziram um estudo para a avaliação da produção intracelular de H₂O₂, da expressão de CD32w e CD16 e da capacidade fagocitária de neutrófilos coletados de pacientes portadores de pancreatite aguda com níveis crescentes de gravidade, comparando-as com as funções de leucócitos obtidos de voluntários sadios. Nesta circunstância, os pesquisadores demonstraram que os neutrófilos de pacientes com níveis mais graves de pancreatite apresentaram, para as três variáveis analisadas, índices superiores aos dos leucócitos dos pacientes com pancreatite leve os quais, por sua vez, apresentaram índices mais elevados quando comparados às células dos voluntários sadios (SIMMS; D'AMICO, 1994).

Posteriormente, Wenisch e colaboradores demonstraram que os neutrófilos de pacientes com sepse por bactérias Gram-negativo apresentavam capacidades suprimidas de produção de ROS e de fagocitose de *Escherichia coli* quando comparadas às células de voluntários sadios. Evidenciaram também que a adição *ex-vivo* de imunoglobulinas policlonais era capaz de aumentar, de maneira dose-dependente, as funções deprimidas de produção de ROS e de fagocitose desempenhadas pelos leucócitos dos pacientes sépticos (WENISCH *et al.*, 1999). Posteriormente, o mesmo grupo avaliou a capacidade funcional de neutrófilos de pacientes com choque séptico, comparando-a com o desempenho apresentado pelos leucócitos de voluntário sadios. A porcentagem de bactérias fagocitadas, o número de *Escherichia coli* internalizada por cada neutrófilo e a porcentagem de bactérias mortas foram inferiores nos leucócitos coletados dos pacientes sépticos. Além disto, estas células apresentaram níveis reduzidos de quimiotaxia e produção de ROS, quando comparadas aos leucócitos dos voluntários (WENISCH *et al.*, 2001)

Sucedendo os primeiros resultados apresentados por Wenisch, o grupo de Hofman e colaboradores publicaram dois estudos avaliando a capacidade fagocitária de neutrófilos humanos em situações adversas. No primeiro estudo, o índice de fagocitose destes leucócitos foi avaliado *ex-vivo* antes e após a migração dos mesmos através de camadas de epitélio intestinal compostas por células de câncer de cólon cultivadas. Tal migração simulava o processo de deslocamento dos neutrófilos em direção ao lúmen intestinal para o combate de infecções localizadas naquele sítio. Foi observado que os leucócitos, após esse fenômeno de migração, apresentavam índices de fagocitose significativamente superiores quando comparados aos índices apresentados por essas células antes do processo de deslocamento transepitelial. Além disso, foi também evidenciado um dramático aumento na expressão celular de CD11b/CD18, moléculas que sabidamente participam do processo de fagocitose mediado por PMN (HOFMAN *et al.*, 2000). No segundo estudo, esse mesmo grupo de pesquisa avaliou a atividade fagocitária de leucócitos PMN humanos quando estimulados pelo fator necrotizante citotóxico (CNF-1) produzido por cepas de

Escherichia coli uropatogênica. Foi demonstrado que esse fator, embora estimule a produção de superóxidos e a aderência destes leucócitos às células cultivadas de epitélio intestinal, determina uma significativa depressão da atividade fagocitária mediada por tais células (HOFMAN *et al.*, 2000).

Estudo brasileiro que comparou a atividade quimiotática de neutrófilos de pacientes sépticos e de voluntários sadios em resposta ao fMLP e ao leucotrieno B₄ demonstrou que os neutrófilos de pacientes sépticos apresentaram resposta quimiotática suprimida quando comparados às células dos voluntários e que tal função apresentava-se significativamente mais reduzida quando avaliados os leucócitos de pacientes sépticos que faleceram durante o período de seguimento (TAVARES-MURTA *et al.*, 2002). Tais resultados foram corroborados por Arraes e colaboradores, que demonstraram resposta quimiotática reduzida ao fMLP, ao leucotrieno B₄ e à IL-8 entre os neutrófilos de pacientes sépticos quando comparados às células de voluntários sadios (ARRAES *et al.*, 2006). Outro estudo brasileiro, conduzido por Martins e colaboradores, demonstrou que as células de pacientes com sepse grave ou choque séptico apresentaram atividade fagocitária superior e com maior produção de ROS, quando comparadas às células de voluntários sadios (MARTINS *et al.*, 2003).

Posteriormente, ao comparar funções da imunidade inata mediadas por leucócitos PMN de pacientes sépticos e de voluntários sadios, Kaufmann e colaboradores demonstraram que, embora a produção de H₂O₂ pelos leucócitos dos pacientes sépticos após estímulo com fMLP era superior à produção pelas células dos voluntários sadios, a fagocitose de partículas de zimosan não opsonizadas com plasma autólogo pelos leucócitos dos pacientes com sepse encontrava-se sensivelmente reduzida. Indispensável pontuar que, a atividade fagocítica dos neutrófilos sépticos aumentou e, inclusive ultrapassou, a atividade fagocitária dos neutrófilos sadios quando as partículas de zimosan forma opsonizadas com plasma autólogo. Interessante notar que a supressão da atividade fagocitária variou de acordo com o nível de gravidade da sepse: enquanto esta resposta apresentava-se apenas discretamente reduzida nos pacientes com sepse simples, a mesma encontrava-se profundamente suprimida nos pacientes com choque séptico, corroborando a hipótese de imunossupressão acentuada apresentada pelos pacientes com sepse grave (KAUFMANN *et al.*; 2006).

Com o objetivo de avaliarem os possíveis efeitos que a proporção aumentada de formas circulantes imaturas de neutrófilos é capaz de determinar na resposta imune global, Taneja e colaboradores analisaram os índices de fagocitose das formas maduras e imaturas de neutrófilos provenientes de pacientes sépticos, comparando com os índices apresentados pelos leucócitos

de voluntários sadios. Os pesquisadores demonstraram que os neutrófilos maduros de pacientes sépticos apresentaram taxas de fagocitose superiores quando comparados às formas também maduras obtidas dos voluntários. Em contraste, as formas imaturas dos pacientes apresentaram índices de fagocitose inferiores às formas maduras obtidas tanto dos pacientes quanto dos voluntários. Tal achado sugere que o aumento da proporção de neutrófilos imaturos circulantes, fenômeno habitual nos pacientes com sepse, pode determinar um impacto na capacidade fagocitária global, reduzindo-a de forma significativa (TANEJA *et al.*, 2008).

Outro estudo brasileiro avaliou a atividade fagocitária de macrófagos obtidos de peritônio de ratos quando cultivado com soro de pacientes com diferentes níveis de gravidade de sepse. Os pesquisadores demonstraram que a secreção de TNF- α e IL-1 β pelos macrófagos ativados com o soro de pacientes sépticos foi superior à secreção de tais citocinas pelos macrófagos ativados com o soro de voluntários sadios. Entretanto, foi demonstrado que a quantidade de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β) liberadas pelos macrófagos submetidos ao soro de pacientes que faleceram pela sepse foi inferior aos níveis liberados pelos pacientes sépticos que sobreviveram. Em contraste, a secreção de interleucina 10 (IL-10) por macrófagos ativados pelo soro de pacientes sépticos que não sobreviveram foi superior à quantidade liberada quando tais células foram estimuladas pelo soro de pacientes que sobreviveram. Embora a técnica utilizada nesse estudo para a avaliação da fagocitose não permita diferenciar entre as partículas que permaneceram ligadas às células daquelas que foram realmente fagocitadas, os resultados apresentaram níveis inferiores de fagocitose nos macrófagos que foram submetidos ao soro de pacientes com choque séptico, quando comparados com os outros níveis de gravidade da sepse (PECK *et al.*, 2009).

Finalmente, na tentativa de correlacionarem os índices de fagocitose dos neutrófilos e monócitos obtidos de pacientes com sepse grave com o prognóstico desta condição, Danikas e colaboradores demonstraram que a atividade fagocitária suprimida de neutrófilos apresentou-se como fator preditor independente de mortalidade entre os pacientes sépticos (DANIKAS *et al.*, 2008). De maneira oposta, o estudo de Schreiner e colaboradores, conduzido na tentativa de padronizarem os ensaios de fagocitose, demonstrou atividade fagocitária mais elevada entre neutrófilos de pacientes sépticos quando comparados às células de voluntários sadios (SCHREINER *et al.*, 2011).

3. JUSTIFICATIVA

A despeito dos inúmeros avanços obtidos no entendimento da resposta imune na SIRS e na síndrome séptica ao longo das últimas décadas, diversos aspectos permanecem incompreendidos. A complexidade da resposta imune, aliada às suas infinitas correlações, representa por si um imenso desafio.

Em vista da multiplicidade de fenômenos relativos às alterações do sistema imune observadas na sepse e nos pacientes com SIRS, optamos, neste trabalho, por focar sobre o estudo de dois aspectos referentes à imunidade inata: a fagocitose e quimiotaxia. Conforme mencionado, o número de trabalhos que abordaram esse tema é relativamente pequeno, envolvendo um pequeno número de pacientes e com resultados conflitantes. Uma das possíveis explicações para as diferenças de resultados encontradas nesses múltiplos estudos pode estar relacionada ao uso de diferentes estímulos indutores dos mecanismos de defesa da resposta imune inata e à análise de funções de diferentes células efetoras. Além disso, fatores associados à heterogeneidade das populações estudadas nos diferentes trabalhos (*e.g.*, faixa etária, imunossupressão, uso de corticóides, perfil da unidade de terapia intensiva) podem ter contribuído para a inconsistência dos resultados. Entretanto, um ponto em comum entre a maior parte dos estudos conduzidos nesse campo foi a utilização de leucócitos dos próprios pacientes sépticos coletados no momento do diagnóstico da resposta inflamatória sistêmica. Nenhum dos estudos avaliou os efeitos que o plasma de pacientes sépticos pode exercer, isoladamente e de maneira prospectiva, sobre funções da imunidade inata mediadas por neutrófilos humanos supostamente saudáveis e todas as comparações foram realizadas entre pacientes sépticos e indivíduos saudáveis, sem a inclusão de outro importante grupo de pacientes críticos, representado por pacientes com SIRS de etiologia não-infecciosa.

Pelo exposto, consideramos relevante e justificada a condução deste estudo.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar, *in vitro*, as alterações induzidas pelo plasma de pacientes sépticos nas atividades fagocitária e quimiotática exercidas por neutrófilos humanos supostamente saudáveis, comparando-as com os efeitos determinados pelo plasma obtido de controles sem sepse, internados em centro de terapia intensiva.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar as atividades fagocitária e quimiotática de neutrófilos sadios, observadas sob a influência de plasma séptico, com aquelas observadas sob a influência de plasma de pacientes com SIRS de etiologia não-infecciosa e de pacientes sem SIRS
- Caracterizar o comportamento das atividades fagocitária e quimiotática induzidas pelo plasma de pacientes sépticos ao longo dos 28 dias de seguimento clínico
- Avaliar a associação entre gravidade, medida por escores internacionalmente aceitos em terapia intensiva, e as atividades fagocitária e quimiotática de neutrófilos observados sob a influência do plasma coletado no momento da inclusão no estudo
- Avaliar a associação entre as alterações das atividades fagocitária e quimiotática e a mortalidade de pacientes criticamente enfermos

5. METODOLOGIA

5.1. DESENHO DO ESTUDO

Tratou-se de um estudo prospectivo e observacional, constituído de duas fases: (1) fase de estudo clínico, realizada em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil e; (2) fase de estudo experimental, conduzida em Genebra, Suíça.

5.2. LOCAIS DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

A fase clínica do estudo foi realizada na UTI do Hospital Universitário “Risoleta Tolentino Neves” (HRTN), Belo Horizonte, Brasil, através de recrutamento clínico e observacional diário de pacientes internados nesse setor no período de junho a dezembro de 2008. O HRTN é um hospital público e geral que participa da rede estadual de atendimento hospitalar, atendendo à região metropolitana de Belo Horizonte. A UTI do HRTN possui 30 leitos gerais (*i.e.*, clínicos e cirúrgicos, incluindo politrauma) e apresentou cerca de 120 internações/mês no ano de 2008.

A fase experimental foi realizada no Laboratório de Cuidados Intensivos do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Genebra, Suíça, sob coordenação do Dr. Jérôme Pugin, nos períodos de abril a julho de 2009 e setembro a dezembro de 2011.

5.3. FASE CLÍNICA

5.3.1. SUJEITOS DA PESQUISA E GRUPOS DE ESTUDO

Todos os pacientes internados na UTI do HRTN no período de junho a dezembro de 2008 foram considerados para inclusão no estudo, mediante avaliação diária procedida por um dos investigadores envolvidos no projeto (OLIVEIRA, C.R.A.).

Caso fossem elegíveis (*i.e.*, critérios de inclusão e de exclusão satisfeitos), os pacientes foram incluídos em um dos três seguintes grupos de estudo:

- **Pacientes com sepse:** composto por pacientes portadores de SIRS com infecção sistêmica suspeita ou confirmada
- **Pacientes com SIRS não-infecciosa:** composto por pacientes portadores de SIRS, sem infecção suspeita ou confirmada

- **Pacientes sem SIRS:** composto por pacientes sem critérios de SIRS, portadores de um diagnóstico alternativo

As definições de sepse e sua classificação de gravidade (i.e, sepse, sepse grave ou choque séptico) foram baseadas nos conceitos estabelecidos pelo *American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee* (ACCP/SCCM, 1992).

Em concordância com as múltiplas críticas existentes na literatura em relação à falta de especificidade dos critérios de SIRS estabelecidos pela ACCP/SCCM em 1992, optou-se por considerar como portadores de SIRS apenas os pacientes que apresentassem, no momento da inclusão no estudo, pelo menos três dos quatro critérios listados abaixo:

- Temperatura axilar > 38°C ou < 36°C
- Frequência cardíaca > 90 batimentos/minuto
- Frequência respiratória > 20 incursões/minuto ou Pressão arterial de gás carbônico (PaCO₂) < 32 mmHg
- Global de leucócitos > 12.000 células/mm³ ou < 4.000 células/mm³ ou presença de mais de 10% de formas imaturas circulantes

No grupo de pacientes sem SIRS, foram incluídos aqueles que preencheram no máximo, em qualquer momento de seguimento no estudo, apenas um dos critérios acima relacionados.

Considerando-se as limitações de sensibilidade dos estudos microbiológicos na detecção e identificação dos patógenos relacionados aos casos de sepse, os pacientes desse grupo foram subdivididos em duas categorias assim definidas:

- **Pacientes com sepse suspeita:** definido a partir da suspeição registrada pelo médico-assistente de uma infecção bacteriana sistêmica, que motivou a instituição de propeidêutica e terapia antimicrobiana pertinentes
- **Pacientes com sepse confirmada:** definido a partir de uma infecção bacteriana microbiologicamente documentada. Isso significou o isolamento de pelo menos um microorganismo considerado significativo pelo médico-assistente em culturas realizadas até 48h antes do diagnóstico de sepse

A partir da inclusão no estudo, cada paciente foi identificado com um número individual que foi utilizado para o registro de suas informações e para a identificação das amostras de plasma coletadas.

5.3.1.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Para inclusão em um dos três grupos de estudo, foram considerados os seguintes critérios:

- Pacientes internados na UTI do HRTN no momento da inclusão
- Pacientes com idade igual ou superior a 18 anos
- Consentimento livre e informado concedido pelo próprio paciente ou, em caso de impossibilidade, por familiar responsável

5.3.1.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram considerados os seguintes critérios de exclusão:

- Pacientes com infecção pelo HIV, independentemente do *status* imunoviológico
- Pacientes submetidos a transplante de órgãos sólidos ou de medula óssea
- Pacientes recebendo doses de corticosteróides superiores a 40mg/dia de prednisona ou equivalente por mais de duas semanas ou qualquer outro tipo de terapia imunossupressora no último mês
- Pacientes recebendo ou que receberam tratamento quimioterápico no último mês ou com previsão de realização do mesmo nos próximos 28 dias
- Pacientes neutropênicos com contagem de polimorfonucleares < 500 células/mm³ ou < 1.000 células/mm³ com previsão de redução para menos de 500 células/mm³ nas próximas 48 horas
- Pacientes com suspeita ou confirmação de sepse de etiologia não bacteriana
- Pacientes recebendo antimicrobianos há mais de 48 horas do momento de inclusão no estudo
- Pacientes com critérios de SIRS identificados há mais de 48h do momento de inclusão no estudo
- Pacientes com limitação de esforços terapêuticos no momento de inclusão ou em qualquer tempo do seguimento no estudo (definido pelo médico-assistente)
- Pacientes que mudaram de grupo de estudo nos primeiros três dias de seguimento

5.3.2. PLANO DE COLETA, PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE PLASMA

Após a inclusão, foram coletadas amostras de plasma de cada paciente participante do estudo de acordo com calendário específico assim estabelecido: Dia 01 (D01 – dia da inclusão no estudo), Dia 02 (D02), Dia 03 (D03), Dia 05 (D05), Dia 10 (D10), Dia 20 (D20) e Dia 28 (D28) ou até a alta, transferência hospitalar ou óbito do paciente, caso ocorressem antes dos 28 dias de seguimento.

Em cada um dos sete dias programados, foram coletados 05 mL de sangue dos pacientes incluídos em tubos contendo heparina (BD Vacutainer SST Plus plastic tubes: *Becton Dickinson Diagnosis Systems*, São Paulo, Brasil), totalizando um máximo de até 35 mL por paciente para todo o estudo.

As amostras de sangue foram coletadas através de punção venosa periférica juntamente com os demais exames solicitados diariamente pelo médico-assistente.

Após a coleta, as amostras de sangue eram imediatamente centrifugadas e o plasma obtido desse processo era separado em duas alíquotas contendo 01 mL cada uma. Cada amostra foi identificada com a data da coleta e o número recebido por cada paciente no momento da inclusão.

Após a centrifugação, as amostras de plasma eram imediatamente estocadas em freezer a -80°C até o envio para o Laboratório de Cuidados Intensivos do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Genebra, Suíça, onde os testes de fagocitose e quimiotaxia foram realizados.

5.3.3. SEGUIMENTO CLÍNICO

Todos os pacientes incluídos no estudo foram avaliados diariamente por um dos investigadores do projeto (OLIVEIRA, C.R.A.) pelo período de 28 dias contados a partir do momento da inclusão, ou até a alta hospitalar ou óbito, caso ocorressem primeiro.

Um formulário individual foi especialmente desenvolvido para o registro das variáveis clínicas e laboratoriais (apêndice 1) coletadas durante o estudo. Tais informações foram obtidas a partir dos prontuários hospitalares dos indivíduos incluídos e os dados relativos à história pregressa dos pacientes foram registrados a partir de entrevistas com o próprio paciente ou familiar responsável.

As variáveis obtidas a partir do acompanhamento diário dos pacientes e que foram utilizadas para a análise final dos dados, juntamente com os resultados dos testes de fagocitose estão abaixo relacionadas:

- Idade e sexo
- Comorbidades pregressas
- Motivo(s) da admissão na UTI
- *Simplified Acute Physiology Score (SAPS 3)*
- Classificação da sepse
- Sítio primário de infecção
- Resultados microbiológicos
- Antibioticoterapia
- Ocorrência de infecção nosocomial
- *Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA)*
- Disfunções orgânicas
- Terapêuticas específicas instituídas
- Sinais vitais e parâmetros respiratórios
- Tempo de internação na UTI
- Tempo de internação hospitalar
- Mortalidade por qualquer causa na UTI
- Mortalidade por qualquer causa nos 28 dias de seguimento
- Mortalidade hospitalar por qualquer causa

As solicitações dos exames laboratoriais, assim como de coleta de materiais para realização de estudos microbiológicos e os pedidos de exames de imagem foram realizadas exclusivamente pelo médico-assistente, de acordo com as indicações clínicas.

As decisões propedêuticas e terapêuticas relativas aos pacientes incluídos no estudo ficaram também, exclusivamente, a cargo do médico-assistente.

5.3.3.1. DEFINIÇÃO DE VARIÁVEIS

As variáveis acima relacionadas e utilizadas na análise final dos dados foram assim definidas:

- Comorbidades pregressas: registradas a partir de informações do prontuário médico e/ou através de entrevistas com os pacientes ou familiares responsáveis
 - Insuficiência Cardíaca Congestiva
 - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
 - Doença vascular arterial periférica
 - Doença cérebro-vascular
 - Insuficiência Renal Crônica
 - Insuficiência Hepática
 - *Diabetes Mellitus* insulino-dependente
 - *Diabetes Mellitus* não insulino-dependente
 - Doença dermatológica crônica
 - Neoplasia

- SAPS 3 (MORENO *et al.*, 2005; METNITZ *et al.*, 2005): calculado a partir dos registros médicos e de enfermagem e dos exames laboratoriais referentes às primeiras 24h de admissão na UTI

- Classificação da sepse: definida no momento da inclusão no estudo, a partir das definições da ACCP/SCCM (ACCP/SCCM, 1992)
 - Sepse
 - Sepse grave
 - Choque séptico

- Sítio primário de infecção: estabelecido pelo médico-assistente e registrado no prontuário médico
 - Pulmões / trato respiratório inferior
 - Trato urinário
 - Abdome
 - Acessos vasculares
 - Sistema Nervoso Central
 - Pele e partes moles
 - Ferida operatória / sítio cirúrgico

- Infecção nosocomial: definida como episódio infeccioso iniciado após as primeiras 72h da inclusão no estudo associado ao início de antibioticoterapia ou troca/adição de antibióticos ao esquema em uso

- SOFA (VINCENT *et al.*, 1996): calculado diariamente durante a permanência na UTI, a partir dos registros médicos e de enfermagem e dos resultados dos exames laboratoriais. As variáveis que não foram mensuradas na ocasião da internação na UTI (ex: bilirrubina total) foram consideradas normais ou, quando não foram avaliadas diariamente, foram considerados os valores referentes ao dia mais próximo. Para os pacientes em uso de sedação, foi considerada a pontuação na escala de coma de Glasgow registrada anteriormente ao início da medicação sedativa

- Disfunções orgânicas: avaliadas diariamente durante toda a permanência na UTI e definidas a partir dos registros médicos e de enfermagem e dos resultados dos exames laboratoriais
 - Choque: necessidade do uso de aminas vasoativas para manter perfusão adequada (ACCP/SCCM, 1992)
 - Insuficiência cardíaca: achados clínicos sugestivos de insuficiência ventricular esquerda e/ou direita ou elevação das pressões de enchimento do ventrículo direito ou índice cardíaco baixo ($<2,2\text{L}/\text{min}/\text{m}^2$), na ausência de tamponamento cardíaco ou arritmias graves (HUGGONET *et al.*, 2003)
 - Insuficiência respiratória: frequência respiratória <5 ou >50 incursões/minuto, ou necessidade de ventilação com pressão positiva, sem preencher critérios para SARA (ABRAHAM *et al.*, 1997)
 - SARA: presença de infiltrado pulmonar bilateral à telerradiografia simples de tórax e gradiente alvéolo-arterial > 250 mmHg ou pressão arterial de oxigênio (PaO_2) / fração inspirada de oxigênio (FiO_2) < 280 na ausência de doença cardíaca ou pulmonar, ou < 200 se pneumonia (ABRAHAM *et al.*, 1997)
 - Insuficiência renal: creatinina sérica $> 3\text{mg}/\text{dL}$ ou necessidade de terapia de substituição renal de urgência, na ausência de doença renal crônica (DRC). Se presença de DRC, aumento de pelo menos duas vezes do valor basal da creatinina sérica (ABRAHAM *et al.*, 1997)
 - Insuficiência hepática: elevação aguda da bilirrubina total para níveis superiores a $3\text{mg}/\text{dL}$ e elevação das transaminases para valores superiores a três vezes do limite

superior da normalidade, na ausência de doença primária do fígado (ABRAHAM *et al.*, 1997)

- Coagulação intravascular disseminada: presença de sangramento espontâneo em pelo menos dois sítios distintos associada à contagem de plaquetas inferior a 50.000/ μ L e fibrinogênio < 200 mg% (HUGGONET *et al.*, 2003)
- Coma: pontuação na escala de coma de Glasgow inferior a 10 ou queda de pelo menos três pontos, se déficit prévio (ABRAHAM *et al.*, 1997)
- Acidose: pH sanguíneo < 7,3 e/ou bicarbonato < 18 mmol/L

➤ Terapêuticas específicas instituídas: avaliadas diariamente durante a permanência na UTI, a partir das prescrições médicas e registros de enfermagem

- Corticoterapia em doses imunossupressoras
- Aminas vasoativas
- Ventilação mecânica (VM)
- Hemodiálise
- Insulinoterapia intensiva
- Controle cirúrgico de foco infeccioso

➤ Sinais vitais: avaliados diariamente durante toda a permanência na UTI e obtidos a partir dos registros médicos e de enfermagem. Foram registrados os valores indicativos de maior gravidade dentro das 24h

- Temperatura axilar
- Pressão arterial
- Frequência cardíaca
- Frequência respiratória
- Oximetria de pulso

➤ Parâmetros respiratórios: avaliados diariamente durante toda a permanência na UTI e obtidos a partir dos registros médicos e de enfermagem. Foram registrados os valores indicativos de maior gravidade dentro das 24h

- FiO₂
- Parâmetros de ventilação mecânica
- Índices gasométricos

5.4. FASE EXPERIMENTAL

A fase experimental foi realizada no Laboratório de Cuidados Intensivos do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Genebra, Suíça, nos períodos de abril a julho de 2009 e setembro a dezembro de 2011.

As amostras de plasma coletadas entre os meses de junho a dezembro de 2008 permaneceram conservadas em freezer -80°C e uma das alíquotas de todas elas foi enviada, devidamente conservada em gelo seco, à Genebra em abril de 2009. Esse transporte realizou-se de acordo com as exigências da legislação nacional vigente e as normas estabelecidas pelo Comitê Nacional de Pesquisa (CONEP).

5.4.1. CULTIVO CELULAR

A avaliação das influências que o plasma coletado dos diferentes pacientes exerceu sobre a atividade fagocitária e a resposta quimiotática de neutrófilos humanos supostamente saudáveis foi realizada a partir da utilização de células HL-60, derivadas de leucemia promielocítica humana (COLLINS; GALLO; GALLAGHER, 1977; GALLAGHER *et al.*, 1979). A técnica utilizada para o cultivo de células HL-60 foi baseada em estudos disponíveis na literatura (BLAIR; CARBONE; SARTORELLI, 1986; ROBERTS, 1990; JACOB *et al.*, 2002; FLECK; ROMERO-STEINER; NAHM, 2005; SHUTTO *et al.*, 2007).

Estoques de HL-60 congeladas em nitrogênio líquido (aproximadamente $5,6 \times 10^6$ células) foram diluídos e re-expandidos em frascos de cultura de 75 mL a fim de atingir-se uma densidade celular aproximada de 6×10^5 células/mL em um meio contendo 90% de RPMI 1640 com 1% de L-glutamina (Gibco Products, Invitrogen, Grand Island, NY) suplementado com 10% de soro fetal bovino livre de complemento (FCS, Amimed, Basel, Switzerland) e antibióticos (PGGH = penicilina G + gentamicina + L-glutamina + hepez). Tais frascos serviram como “matrizes” para a realização da série de culturas posteriores.

As culturas subseqüentes, cujas células diferenciadas em granulócitos foram utilizadas para a realização dos testes, foram conservadas em frascos de 150 mL em meio de cultura semelhante ao anterior, porém com o acréscimo, em dias específicos, de dimetilsulfóxido (DMSO) para induzir tal diferenciação. Os frascos de cultura ficaram armazenados na posição horizontal em incubadoras a 37°C e 5% CO_2 .

Como já sabido que as células HL-60 sob tratamento de DMSO demoram cerca de sete a dez dias para adquirirem fenótipo de neutrófilo (JACOB *et al.*, 2002), o calendário da série de culturas foi organizado da seguinte forma:

- Dia 01: cerca de 3×10^7 células eram obtidas do frasco matriz e acrescidas de 150 mL do meio de cultura padronizado (90% de RPMI 1640 com 1% de L-glutamina + 10% de soro fetal bovino + PGGH). O volume de 1,8 mL de DMSO era acrescido posteriormente à solução, a fim de obter-se uma concentração no meio de 1,2%. A concentração final de células nessa solução era de aproximadamente 2×10^5 células/mL
- Dia 04: os 150 mL da cultura celular eram centrifugados para separar o meio de cultura das células. Após esse procedimento, 150 mL de meio de cultura fresco e 1,8 mL de DMSO eram novamente adicionados às células
- Dia 07: utilização das células para a realização dos testes dos experimentos

5.4.2. PREPARAÇÃO DO PLASMA

As amostras de plasma recebidas do Brasil permaneceram conservadas em freezer a -80°C na Suíça, até que fossem utilizadas para a realização dos experimentos.

Para a realização dos testes, os plasmas foram descongelados e submetidos a uma segunda centrifugação para a separação de plaquetas. Após esse procedimento, foram aquecidos a 56°C por 30 minutos, a fim de que se tornassem livre de complemento. Uma terceira centrifugação foi realizada para a eliminação de resíduos e, a partir daí, as amostras eram divididas em alíquotas menores, a fim de se evitar descongelamentos repetidos dos plasmas a serem testados.

5.4.3. TESTES DE OPSONOFAGOCITOSE

Os testes de opsonofagocitose tiveram como base metodológica experimentos realizados em estudos já publicados (ROMERO-STEINER *et al.*, 1997; SCHIFF *et al.*, 1997; POUSSIN *et al.*, 1998; GUY *et al.*, 200; RAMET *et al.*, 2002; TISSIERES *et al.*, 2008).

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas biopartículas fluorescentes (*E.coli*, cepa K-12, BODIPY FL BioParticles, lote 586789, Invitrogen, OR) previamente suspensas em PBS azido a 02 mM, a fim de obter-se uma concentração de 6×10^6 partículas/ μL . Estipulou-se uma relação de 50 partículas/célula, o que significava que para a quantidade de 5×10^5 células colocadas em cada câmara da placa de experimento foram necessários 4,16 μL da solução de

biopartículas. O plasma utilizado era diluído 20 vezes em PBS (-) CaCl₂ e MgCl₂ (Gibco Products, Invitrogen, Grand Island, NY), para atingir-se uma concentração final de 5%.

Cada plasma era testado em três condições distintas: quando as células efetoras eram submetidas à ação de citocalasina D (Sigma-aldrich, Saint Louis, MO), aos 20 e 50 minutos de fagocitose. Isso significa que cada plasma testado ocupava três câmaras da placa, uma para cada condição acima relacionada. A citocalasina atua sobre o sistema celular de microtúbulos, impedindo as alterações do citoesqueleto e, conseqüentemente, a fagocitose. O teste realizado na câmara da citocalasina servia como referência para os testes realizados nas câmaras de 20 e 50 minutos de fagocitose.

Os testes de opsonofagocitose eram divididos em duas fases: fase de opsonização e fase de fagocitose. Na fase de opsonização, o plasma a 5% era incubado com as biopartículas por 1 h, a 37°C e 5% CO₂. Enquanto processava-se a opsonização, 5 x 10⁵ células obtidas do frasco de cultura celular no D07 eram colocadas em cada câmara da placa estéril e, em uma das colunas da placa, era adicionado 100 µM de citocalasina para inibir a fagocitose. A placa contendo as células permanecia incubada por 30 minutos para possibilitar a ação da citocalasina. Decorrida 01 hora do período de opsonização, a solução contendo plasma 5% + biopartículas era centrifugada e lavada duas vezes em PBS (-) CaCl₂ e MgCl₂. Após esse procedimento, a solução encontrava-se pronta para a fase de fagocitose que se iniciava quando esse “mix” era adicionado à cada câmara contendo as células efetoras, mantendo-se a relação de 50 partículas para cada célula e a concentração do plasma a 5%. Primeiramente o “mix” era adicionado à coluna da citocalasina e à coluna de 50 minutos de fagocitose. Procedia-se a incubação da placa, sob agitação, por 30 minutos. Depois desse período, acrescentava-se o “mix” à coluna de 20 minutos de fagocitose e a placa era novamente incubada, sob agitação, por mais 20 minutos. A partir daí, a placa era colocada sobre gelo, para que a fagocitose fosse inibida. Procedia-se a centrifugação da placa a 04°C para que o meio fosse retirado e sobrassem apenas as células no fundo de cada câmara. Um volume de 100 µL de azul de trypan a 0,1% (Life Technologies, Carlsbads, CA) era adicionado a cada câmara para que a fluorescência das bactérias ligadas, mas não fagocitadas fosse mascarada. Assim, durante a leitura do experimento, apenas a fluorescência produzida por biopartículas internalizadas seria visível. A solução contida em cada câmara era então transferida para os tubos de leitura e acrescidos de 200 µL de PBS hSA (PBS enriquecido com albumina na concentração de 0,1%).

Sendo sabido que as células efetoras cultivadas em diferentes frascos de cultura podem apresentar diferenças na capacidade fagocitária, testou-se diariamente a atividade fagocitária

sob a influência de um mesmo “pool” de plasma, para que esse servisse como padronização para o experimento do dia. Esse plasma era constituído da mistura equivalente de dez diferentes plasmas obtidos de indivíduos adultos saudáveis, entre homens e mulheres.

A atividade fagocitária das células HL-60 diferenciadas quando submetidas à ação dos diferentes plasmas foi determinada através de citometria de fluxo (FACS Calibur - *Fluorescence-activated Cell Sorter*, Becton Dickinson) e as análises realizadas através do *BD CellQuest™ Pro software* (version 5.2.1, BD Biosciences). Gráficos FSC-H (*Forward Scatter* = parâmetro de medida do tamanho da célula) *versus* SSC-H (*Side Scatter* = parâmetro de medida da diferenciação celular) foram utilizados para delimitar as células a serem analisadas. Quinze mil eventos foram avaliados em cada tubo em gráficos de *Counts* (contagem celular) *versus* FL1-H (parâmetro de medida da intensidade da fluorescência). O índice de fagocitose aos 20 e 50 minutos foi calculado pelo produto da porcentagem de células que fagocitaram *E.coli* marcadas e a média da fluorescência intracelular. Os índices de fagocitose eram posteriormente normalizados pelo índice de fagocitose do dia do “pool” de plasma, o que possibilitou a comparação de índices de amostras testadas em diferentes placas.

5.4.4. TESTES DE QUIOMIOTAXIA

A capacidade das células HL-60 diferenciadas em neutrófilos migrarem através de um filtro em resposta à fMLP e à IL-8 foi avaliada através da utilização de câmaras de Boyden modificadas (ChemoTX^R System da Neuro Probe, Inc. 96-well, modelo 101-5; poros de 5 µm, Gaithersburg, MD).

A primeira etapa do experimento consistia na incubação do plasma com as células HL-60 diferenciadas em neutrófilos. Cada plasma a ser testado era diluído em RPMI a fim de se obter uma concentração de 20% na solução. 100 µL da solução de plasma a 20% eram então adicionados a 100 µL de uma solução de células na concentração de 4×10^6 células/mL diluídas em RPMI 20% FCS, resultando em uma solução final com uma concentração de 10% de plasma e 2×10^6 células/mL em RPMI 10% FCS. A placa contendo tais soluções era então incubada por 30 minutos a 37°C e 5% CO₂.

Para a execução da segunda etapa do experimento, 31µL de uma solução de fMLP a 10nM (Sigma, St. Louis, MO) ou de IL-8 a 100 ng/mL (doado por C. Power, MerckSerono, Geneva, Switzerland) eram depositados no fundo da câmara, enquanto 20µL de cada solução de neutrófilos a 2×10^6 células/mL + plasma a 10% eram depositados no topo do filtro, em três posições. Com o objetivo de servirem como referência para o experimento, 20 µL de uma solução

contendo apenas células a uma concentração de 2×10^6 células/mL RPMI 10% FCS eram depositados em outros poços do fundo da câmara, abaixo do filtro. Após preparada, a câmara era incubada por 90 minutos a 37°C e 5% CO_2 e os neutrófilos que migraram através do filtro, para a parte inferior da câmara, eram corados com a substância fluorescente DRAQ5™ (Biostatus Limited, Leicestershire, UK) e contadas através do *Applied Biosystems 8200 Cellular Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, CA). A migração celular expressa em % foi calculada pela relação entre o número de células que migraram através do filtro e o número de neutrófilos depositados abaixo do mesmo x 100.

5.5. CÁLCULO DA AMOSTRA

O cálculo amostral em estudos experimentais representa um desafio especialmente grande, em parte pela falta de critérios estabelecidos para a definição amostral nesse tipo de pesquisa. Adicionalmente, à época da concepção deste trabalho, os dados disponíveis na literatura eram ainda mais escassos, o que limitou a obtenção de informações que serviriam de referência para a realização do cálculo amostral. Desse modo, a amostra foi calculada com base em observações preliminares e não publicadas feitas pelo nosso grupo de pesquisa. Assim, esperava-se uma redução de aproximadamente 30% na atividade fagocitária dos neutrófilos expostos ao plasma de pacientes sépticos, quando comparada à atividade fagocitária das células expostas ao plasma de pacientes sem SIRS. Assumindo um erro alfa de 0,05 e um poder de 0,90, o cálculo foi de, no mínimo, 25 pacientes em cada grupo, totalizando um número necessário de 50 pacientes para a realização do estudo. Vale ressaltar que foi considerada apenas uma amostra de plasma, *i.e.*, um teste de fagocitose, por paciente. Para o cálculo da amostra utilizou-se o programa G Power, v. 3.1.3.

5.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Variáveis categóricas foram descritas quanto à frequência absoluta e relativa. Variáveis contínuas foram descritas através de medidas de tendência central e de dispersão mais apropriadas para a distribuição dos dados: a mediana e o intervalo interquartilico foram usados para variáveis de distribuição não normal, enquanto a média e o desvio padrão foram usados para variáveis de distribuição normal. Para testar a normalidade da distribuição dos dados numéricos, foram usados os testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov, bem como a inspeção visual de histogramas de distribuição.

A associação univariada entre variáveis categóricas dos grupos independentes foi avaliada baseando-se nas análises de tabelas de contingência. Para testar a significância estatística global da associação das variáveis, foram utilizados os testes qui-quadrado (χ^2) de Pearson ou exato de Fisher. Utilizou-se o teste exato de Fisher quando 20% ou mais das caselas da tabela de contingência apresentavam frequência esperada menor ou igual a cinco.

Como as amostras eram independentes, os dados contínuos foram comparados através dos testes *U* de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Testes de Friedman e Wilcoxon foram utilizados nas análises comparativas de variáveis contínuas para amostras pareadas (dados longitudinais de pacientes sépticos ao longo do seguimento de 28 dias). O teste de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar a dependência entre duas variáveis não paramétricas. Para os testes globais, o nível de significância estatística foi estabelecido em 0,05, bilateral.

O aplicativo SPSS (versão 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL) e GraphPad Prism software 5.0. (La Jolla, CA) foram utilizados para a análise estatística e a confecção de gráficos.

5.7. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica foi realizada a partir da base de dados do *Medline Interface PubMed*. Os artigos selecionados foram obtidos através do Portal de Periódicos da CAPES e trabalhos científicos referenciados por esses artigos também foram incluídos.

Os termos utilizados na pesquisa foram: sepse, sepse grave, choque séptico, inflamação, imunidade inata, fagocitose, quimiotaxia, neutrófilos, células HL-60, assim como os seus correspondentes em inglês. Foram incluídas as publicações em línguas portuguesa, inglesa e espanhola.

As citações no texto foram indicadas pelo sistema autor/data e as referências bibliográficas foram organizadas em ordem alfabética, de acordo com as normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (FRANÇA; VASCONCELLOS, 2008).

5.8. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi submetido às avaliações do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital “Risoleta Tolentino Neves”, da Câmara do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), do Comitê de Ética em Pesquisa da

UFMG (COEP-UFMG), sendo finalmente aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Como se tratou de um estudo observacional, o manejo clínico dos pacientes incluídos ficou, exclusivamente, a cargo do médico-assistente e o único risco potencial aos sujeitos da pesquisa referiu-se ao da punção venosa periférica, já habitualmente realizada de maneira diária para a realização dos exames laboratoriais necessários.

A inclusão dos pacientes no estudo ocorreu após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelo próprio paciente ou, em caso de impossibilidade, pelo familiar responsável. Antes da assinatura, os pacientes e/ou familiares foram esclarecidos sobre os objetivos do estudo, seus riscos e benefícios (apêndice 2 e apêndice 3).

Os pacientes incluídos foram identificados por números, mantendo em sigilo as identificações pessoais. Apenas os pesquisadores responsáveis tiveram acesso às informações referentes aos sujeitos da pesquisa e as mesmas serão utilizadas apenas para os propósitos estabelecidos neste estudo.

6. ARTIGO

Plasma from septic patients enhances bacterial phagocytosis but impairs chemotaxis by neutrophil-like HL-60 cells

Clara Rodrigues Alves de Oliveira¹, Vandack Nobre¹, Irène Dunn Siegrist², Jérôme Pugin²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical; Departamento de Clínica Médica, School of Medicine and Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

²Laboratory of intensive Care, University Hospitals of Geneva and Department of Microbiology and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Geneva, Switzerland

Address for correspondence and requests for reprints:

Jérôme Pugin, MD

Hôpitaux Universitaires de Genève, Soins Intensifs - site E

4, rue Gabrielle-Perret-Gentil, CH-1211 Genève 14, Switzerland

jerome.pugin@unige.ch

Tel. +41-22-372-9236 ; Fax. +41-22-382-7455

Financial support: the study was partially supported by Swiss National Foundation for Scientific Research and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

Keywords

sepsis, neutrophils, HL-60 cells, phagocytosis, chemotaxis

Abstract

Introduction: Innate immune responses are altered during sepsis and the influence of septic plasma components over phagocytic and chemotactic activities of neutrophils remains to be determined.

Objective: We sought to investigate the effects of plasma from patients with sepsis over the phagocytic and chemotactic activities of neutrophil-like HL-60 cells, comparing these results with those observed with plasma from patients with noninfectious systemic inflammatory response (SIRS) and patients without SIRS.

Design: Prospective observational controlled cohort.

Setting: Tertiary level intensive care unit and research laboratory.

Subjects: 66 intensive care patients, distributed in three groups: septic group (n=31), noninfectious SIRS group (n=24) and controls without SIRS (n=11).

Interventions: Plasma was obtained at the time of sepsis or SIRS diagnosis (day 1), and on days 2, 3, 5, 10, 20 and 28. Phagocytosis tests were performed by adding plasma to neutrophil-like HL-60 differentiated cells and fluorescent *E.coli*. The phagocytic index was measured by flow cytometry after 20' and 50' incubation. The chemotaxis tests were performed in response to fMLP and IL-8 by incubating plasma and differentiated HL-60 cells. Migrating cells were counted by using fluorometric microvolume assay technology.

Measurements and Main Results: Plasma from septic patients enhanced the phagocytic activity of neutrophil-like cells as compared to plasma from noninfectious SIRS and non SIRS controls. The phagocytic activity stimulated by the septic plasma significantly increased over time, from inclusion to day 28. On the other hand, septic plasma inhibited the chemotactic activity of neutrophils induced by fMLP and mainly by IL-8, even though the chemotactic activity to IL-8 recovered during the follow-up in survivors. Higher levels of bacterial phagocytosis and lower levels of chemotaxis to IL-8 were associated with increased 28-day mortality. Taking in account all studied patients, a significant correlation between phagocytic / chemotactic activities and severity (SAPS III and SOFA scores) was observed.

Conclusions: In an *in vitro* model, plasma from septic patients enhances the phagocytic activity and impairs the chemotaxis of neutrophil-like cells. During the follow-up of 28 days, plasma from patients with sepsis determines a progressive increase in phagocytosis and a recover of chemotactic activity, suggesting the existence of a dynamic influence over the neutrophil function. The mechanisms involved in these altered responses, their meaning, and the potential opportunities for therapeutic interventions remain to be further investigated.

Introduction

Sepsis represents a major challenge of contemporary medicine and, despite the advances in its diagnosis and treatment, remains to be the most important cause of death in noncoronary intensive care units (ICU) (MARTIN *et al.*, 2003). The incidence of sepsis continues to rise, bringing along a substantial health care burden and major impact on the implicated costs (ANGUS 2001; MARTIN *et al.*, 2003).

Sepsis describes a complex syndrome resulting from the failure to maintain the balance between excessive and inadequate inflammation. The innate immune system, that is responsible for mounting an immediate response to invading pathogens, can cause cell and tissue damage under an unbalanced inflammatory environment (COHEN, 2002). Neutrophils play a pivotal role in the innate immune response, releasing regulatory cytokines and participating in bacterial phagocytosis and killing (SMITH, 1994; ALVES-FILHO *et al.*, 2008). Several neutrophil functions have been described as being altered in sepsis, including adherence (VEUCZIO; WESTENFELDER; PHAIO, 1982), chemotaxis (HILL *et al.*, 1974; TAVARES-MURTA *et al.*, 2002), degranulation (SOLOMKIN; COTHA; BRODT, 1985), phagocytosis (WENISCH *et al.*, 2001; MARTINS *et al.*, 2003), and production of reactive oxygen species (ROS) (MATULA; PATERSON, 1971; KAUFMANN *et al.*, 2006). However, the literature on this field is quite conflicting, which in some extent reflects the heterogeneity of the experimental protocols used in the different studies (TANEJA *et al.*, 2008).

Investigating the effects of septic plasma over the neutrophil functions represents an unexplored approach to define how and in what extend the innate immune response is altered in sepsis. To address these questions, the aim of this study was to investigate the effects of septic plasma on phagocytosis and chemotactic activities of healthy neutrophil-like cells, comparing that to the effects determined by the plasma from patients with noninfectious SIRS and patients without SIRS.

Material and Methods

Study setting and subjects

We conducted a prospective observational study with patients admitted to the ICU of a university hospital in southeast Brazil (30 bed-mixed surgical and medical ICU, 1,500 admissions per yr). Between June and December 2008, all adult patients (>18 yrs) were daily screened and enrolled into one of the three groups, as following: (1) sepsis group, (2) noninfectious SIRS group and (3) non SIRS group. Sepsis and SIRS were defined according to published guidelines (ACCP/SCCM, 1992). The reasons for exclusion were: 1) sepsis or noninfectious SIRS diagnosed more than 48 hrs before the first assessment for inclusion; 2) known or suspected HIV infection; 3) patients under corticosteroid therapy (above 0.5 mg/kg/day of prednisone or correspondent) for more than two weeks; 4) patients under therapy with any immunosuppressive drug; 5) patients receiving chemotherapy for neoplastic diseases within the last 30 days or with prevision of it within the next 28 days; 6) neutropenic patients (neutrophils < 500 cells/mm³ or < 1000 cells/mm³ with an expected drop to < 500 cells/mm³ in the next 48h); 7) therapeutic effort limitation as decided by the treating physician; 8) change in the initial classification before three days following study inclusion.

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and the International Conference on Harmonization Guidance for Good Clinical Practice. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Federal University of Minas Gerais and by the Brazilian National Ethics Committee. Written informed consent was obtained from all included patients or their next-of-kin.

Study procedures

One of the investigators (CRAO) visited daily the participant ICU in order to identify patients potentially eligible for the study. Variables recorded at inclusion and daily included demographic, clinical and laboratorial data. The severity of disease was assessed by the SAPS III (MORENO *et al.*, 2005; METNITZ *et al.*, 2005) and SOFA (VINCENT *et al.*, 1996) scores. Radiographic diagnostics and microbiological tests (i.e., cultures of urine, blood, blind bronchoalveolar lavage and tracheal aspirates) were carried out at the discretion of treating physicians. No therapeutic intervention was performed as part of the study protocol.

Blood sampling

Fifteen milliliters of peripheral blood was drawn from patients in sterile heparinized syringes on the day of inclusion (day 1) and on days 2, 3, 5, 10, 20 and 28, or until death or hospital discharge. After centrifugation, plasma was stored at -80°C. The samples were sent in dry ice to the Laboratory of Intensive Care of University Hospitals of Geneva, Switzerland, where the phagocytosis and chemotaxis assays were performed.

Phagocytosis assays

For the phagocytosis and chemotaxis assays, we used HL-60 cells differentiated in neutrophils under treatment with 1.2% dimethylsulfoxide (DMSO) for seven days.

As to the phagocytosis experiments, neutrophil-like HL-60 cells were incubated with fluorescently-labeled Gram-negative particles (*E.coli* Bodipy FL BioParticles, Molecular Probes, Eugene, OR). Before incubation with HL-60 cells, bacteria were opsonized for one hour at 37°C, 5% CO₂ atmosphere, with 5% decompartmented plasma (plasma heated 30 min at 56°C). Opsonized bacteria were then centrifugated at 1000g for 15 min at 4°C and washed twice in PBS. To test phagocytosis, 2.5 x 10⁷ fluorescent opsonized bacteria were added to 5 x 10⁵ neutrophils, corresponding to a bacteria-to-cell ratio of 50:1. Phagocytosis was performed at 37°C for 20 and 50 min, in the same buffer as that used during opsonization. Cells were then put on ice, centrifugated at 300 g for four minutes at 4°C, and washed with ice-cold PBS. To only quantify internalized bacteria, extracellular fluorescence was quenched using 0.05% Trypan blue (Life Technologies, Carlsbad, CA), and neutrophils were analyzed by flow cytometry. The negative control consisted in neutrophils pretreated 30 min with 100 µM cytochalasin D, a blocker of phagocytosis (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). In each plate, a pool of plasma sampled from ten different healthy volunteers was also tested. Phagocytosis was quantified as the percentage of cells becoming green (positive) multiplied by their geometric mean of fluorescence, as described elsewhere (RAMET *et al.*, 2002) The results are presented as “phagocytic index” (PI), which was obtained as following: $PI = IPR/PPR$; where IPR (individual phagocytosis result) corresponds to the result of the phagocytic activity for each studied plasma sample, and PPR (pooled phagocytosis result) corresponds to the result of the phagocytic activity observed under the influence of pooled plasma, from healthy volunteers.

Chemotaxis assays

To measure the capacity of DMSO-differentiated HL-60 cells to migrate through a filter, we used a modified Boyden chamber (ChemoTXR System from Neuro Probe, Inc. 96-well format; model 101-5; 5 μ m pores, Gaithersburg, MD). Initially, HL-60 cells were incubated with 10% decompensated plasma for 30 min at 37°C, 5% CO₂ atmosphere. To test chemotaxis, those neutrophils (20 μ L) were deposited on the top of the filter, in triplicates, at the concentration of 2×10^6 cell/mL in RPMI / 10% FCS. IL-8 100 ng/mL (a gift from C. Power, MerckSerono, Geneva, Switzerland) and fMLP 10 nM (Sigma, St. Louis, MO) served as chemoattractants in the lower chamber. Neutrophils which have migrated to the lower chamber after 90 min at 37°C were fluorescently stained with DRAQ5™ (Biostatus Limited, Leicestershire, UK) and counted using the Applied Biosystems 8200 Cellular Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The percentage of cell migration was calculated as the number of neutrophils which migrated through the filter *divided* by the number of neutrophils deposited above the filter *times* 100.

Statistical analysis

Data were collected by using a report form especially created for this study, and then entered in an electronic database for future analysis. The analyses were performed using the *Statistical Package Social Science* (SPSS) software, version 15.0. for Windows (Chicago, IL) and the GraphPad Prism software 5.0. (La Jolla, CA). Categorical variables were expressed as number and percentage. Not normally distributed variables were expressed as median with 25-75% interquartile ranges (IQR).

Comparability among the groups was performed using the tests X^2 (Yates' test or Fisher's exact test), two-sample t test, Mann-Whitney *U* test or Kruskal-Wallis test, as appropriate. The nonparametric Friedman and Wilcoxon tests were used to compare median values observed for the same individual in two or more time points, respectively. Statistical dependence between two non parametric variables was tested using Spearman correlation test. For all statistical tests, significance was reported at a *p* value of 0.05 or less, bilaterally.

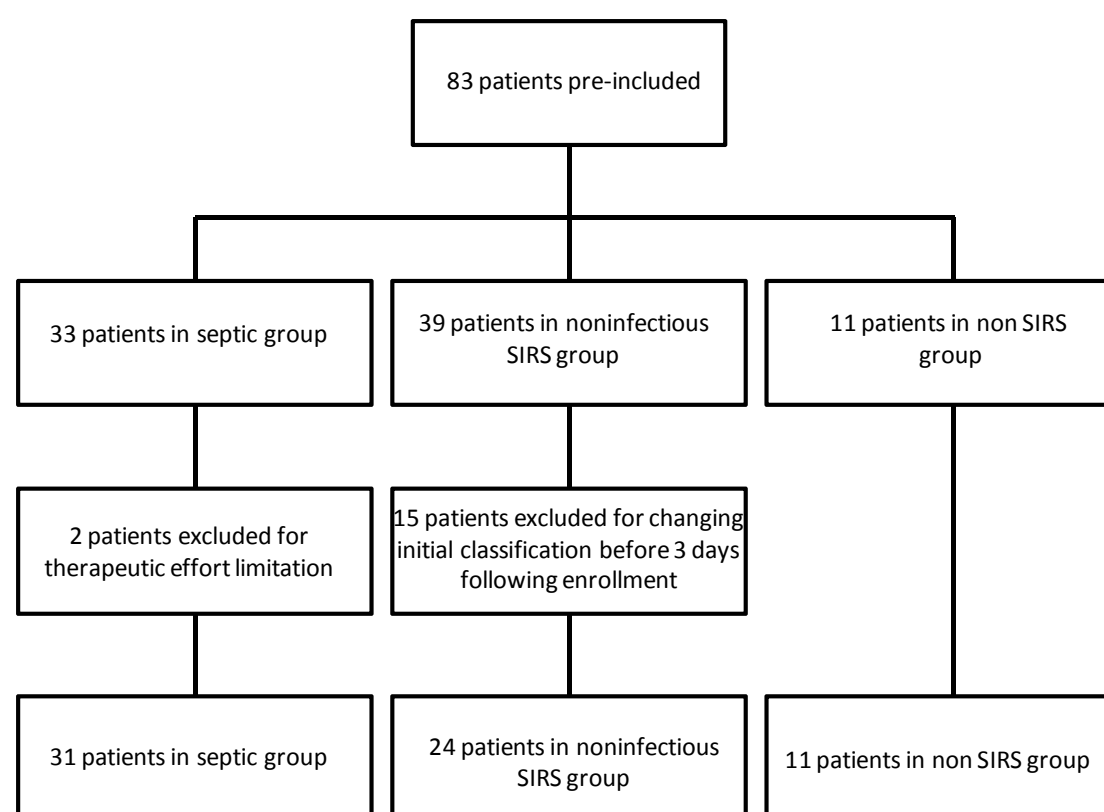
Results

Characteristics of patients

Eighty three patients were initially assessed for potential inclusion; of these, two were excluded because of therapeutic effort limitation determined by the treating physician and 15

were excluded because their initial classification was changed before three days after enrollment (Fig. 1). Therefore, we studied 66 subjects divided into three groups: 31 patients with sepsis (severe sepsis [n = 12] and septic shock [n = 19]), 24 patients with noninfectious SIRS, and 11 critically ill patients without SIRS.

Figure 1. Flowchart of study inclusion



Among the 31 patients with sepsis, 54.5% had pneumonia, 25.8% had abdominal infections, and 19.7% had infections in other sites. Microbiological confirmation occurred in 54.8% of patients with sepsis; *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* were the predominant etiologic agents (35% and 23.5%, respectively). Among patients with noninfectious SIRS and without SIRS, the main diagnoses were polytrauma and unstable angina, respectively. As expected, C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT) levels were significantly higher in patients with sepsis than in those without infection ($p < 0,001$). Patients included in the sepsis group had SAPS III and SOFA severity scores, both measured at inclusion, significantly higher than those included in the other groups ($p < 0.001$ for both scores). However, no difference was observed in the 28-day mortality between patients with sepsis and patients with noninfectious SIRS.

The characteristics of the study population are summarized in the Table 1.

Table 1. Clinical and biological characteristics of the studied patients, according to the group of inclusion

Groups	Sepsis (n=31)	Noninfectious SIRS (n=24)	Without SIRS (n=11)	p
Age, years (IQR)	50,5 (41,7- 67,5)	40 (26.5 - 62.7)	47 (39 - 64)	0.38
Gender	21M/9F	15M/9F	6M/5F	0.64
SAPS III (IQR)	66.5 (61.5 - 73)	51 (38 - 61)	37 (37 - 45)	<0.001
SOFA - D1 (IQR)	8 (5.7 - 10.2)	5 (2 - 8)	2 (0 - 4)	<0.001
Leucocytes x 1000/mL - D1 (IQR)	13.3 (9.7 - 26.2)	12.5 (9.5 - 18.8)	9.5 (7.6 - 10.5)	0.02
C-reactive protein - mg/dL - D1 (IQR)	255.5 (169.7 - 321.4)	131.4 (91.3 - 179.8)	38.9 (15.8 - 96.2)	<0.001
Procalcitonin - ng/mL - D1 (IQR)	10.6 (3.1 - 56.9)	3.1 (0.6 - 6.5)	0.11 (0.1 - 4.5)	<0.001
Mortality in 28 days (%)	13 (41,9)	11 (45,8)	0	0.018
Underlying medical conditions - n (%)				
Congestive heart failure	5 (16.1)	4 (16.7)	2 (18.2)	0.99
Chronic obstructive pulmonary disease	3 (9.7)	0	0	0.09
Chronic renal disease	5 (16.1)	1 (4.2)	3 (27.3)	0.16
Cirrhosis	1 (3.2)	0	0	1
Diabetes Mellitus	6 (19.3)	3 (12.5)	5 (45.4)	0.08

IQR, interquartile range; M, male; F, female; SAPS III, simplified acute physiological score III; SOFA, sequential organ failure assessment score; D1, day 1

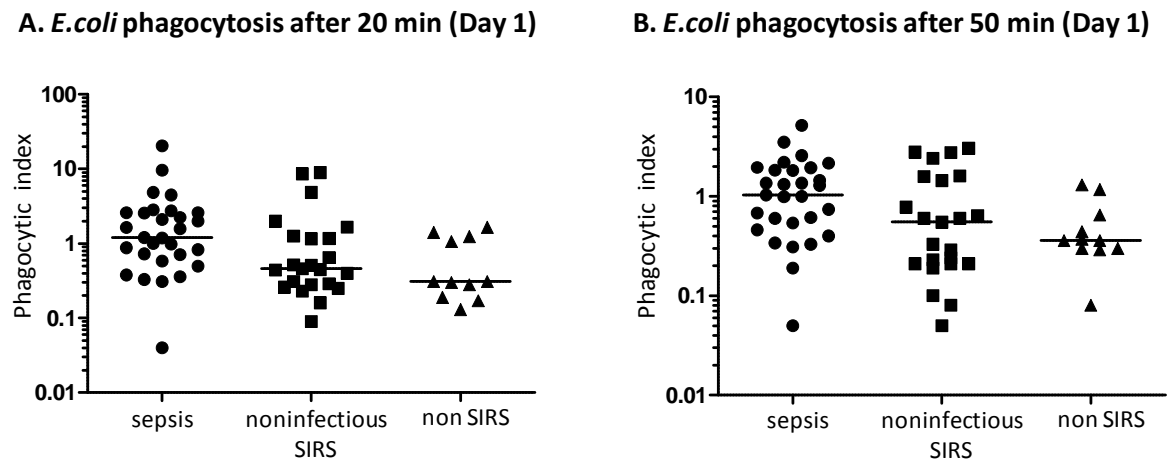
Phagocytosis

Neutrophils-like cells challenged by septic plasma collected at inclusion presented higher phagocytic activity after 20 min (median 1.21; IQR 0.64-2.60) as compared to those challenged by noninfectious SIRS (median 0.46; IQR 0.28-1.26) and non SIRS (median 0.3; IQR 0.18-1.28) plasma; $p=0.009$ (Fig. 2A). Similar results were observed at 50 min, with a significantly higher activity in the sepsis group (median 1.03; IQR 0.50-1.89) than in the noninfectious SIRS group (median 0.55; IQR 0.21-1.58) and in the non SIRS group (median 0.36; IQR 0.29-0.78); $p=0.03$ (Fig. 2B). A difference in the phagocytic activity among the three groups remained significant after 50 min with the plasma obtained on day 2 and day 5 ($p=0.02$, $p=0.001$, respectively).

In the subgroup analysis restricted to the patients with systemic inflammatory response ($n=54$), either due to sepsis or to non infectious conditions, the phagocytic activity was significantly higher after 20 min in the septic group with plasma obtained at inclusion ($p=0.01$), with a trend to significance after 50' incubation ($p=0.06$). An additional analysis was performed within the septic group, including only the 12 septic patients who remained alive until the 28th day. In this case, the phagocytic activity significantly changed during the follow-up, with a growing trend from inclusion to the end of study point (Fig. 3). The difference observed between

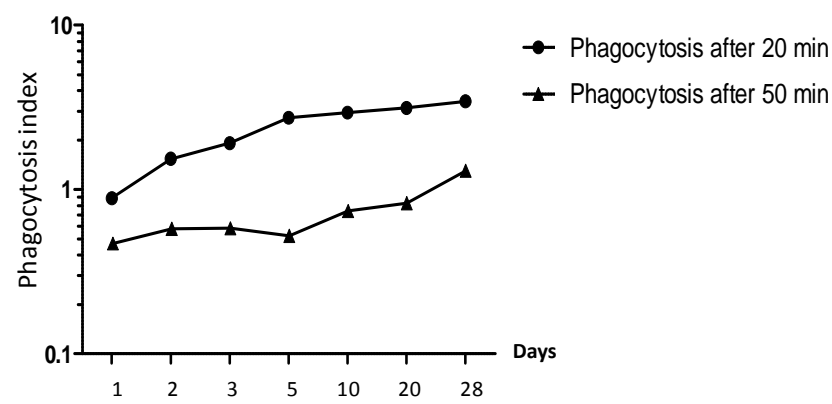
the phagocytic activity measured at inclusion and on day 28, favoring the latter time-point, was significant for both incubation times, 20 min ($p=0.02$) and 50 min ($p=0.03$) (Fig. 4A and Fig. 4B).

Figure 2. Phagocytosis of *E.coli* by neutrophil-like HL-60 cells challenged by septic (n=31), non-infectious SIRS (n=24) and non SIRS (n=11) plasma sampled at study inclusion



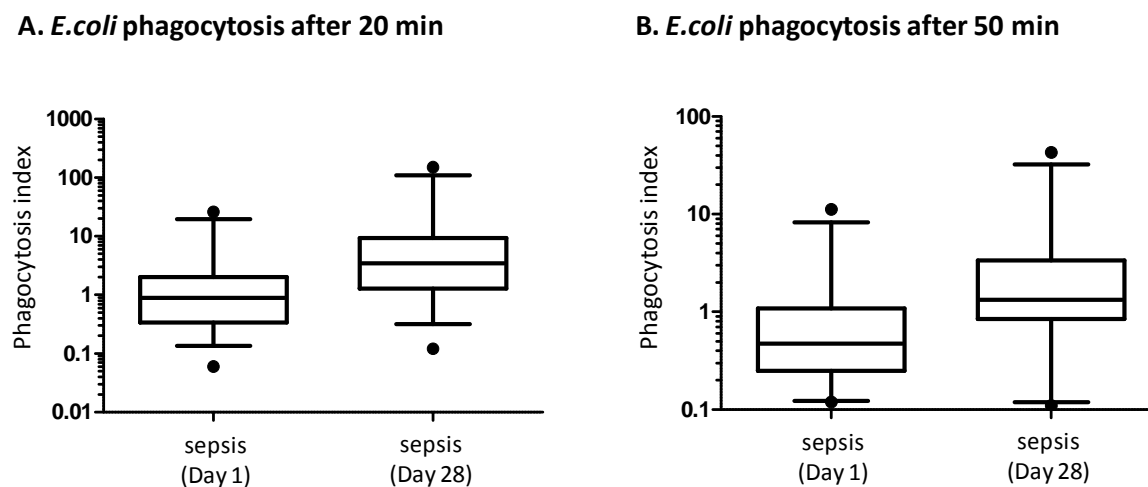
Results are expressed as phagocytosis index (PI) with median (line). PI is expressed in \log_{10} scale.

Figure 3. Evolution of the phagocytosis of *E.coli* by neutrophil-like HL-60 cells during the follow up of the 12 septic patients who were alive on the 28th day (n=12)



Results are expressed as phagocytosis index (PI) with median (dots). PI is expressed in \log_{10} scale.

Figure 4. Comparison of *E.coli* phagocytosis by neutrophil-like HL-60 cells between days 1 and 28 among septic patients who survived until the 28th day of follow up (n=12)



Box plots with median phagocytosis indexes (PI), interquartile ranges, percentiles 10 to 90 (whiskers), and outliers as dots. PI is expressed in \log_{10} scale.

Chemotaxis

The chemotactic activity of neutrophils in response to fMLP measured at inclusion was significantly inhibited by septic plasma (median 12.8%; IQR 12-14.25%) in comparison with that observed under influence of the plasma from noninfectious SIRS (median 14.1%; IQR 12.4-14.6%) and non SIRS (median 15.2%; IQR 13.9-15.8%) groups; $p=0.007$ (Fig. 5A). The same trend was observed when IL-8 was used as chemoattractant, with significant reduction in the chemotaxis with plasma from septic patients (median 4.1%; IQR 3.3-5.15%), as compared to plasma from noninfectious SIRS (median 5%; IQR 3.4-7.2%) and non SIRS (median 7.2; IQR 6.2-7.5%) individuals; $p<0.0001$ (Fig. 5B). Plasma from patients with sepsis decreased IL-8-dependent chemotactic activity more than that obtained in patients with SIRS, at the time of inclusion, on day 2, and on day 3 ($p=0.05$, $p=0.06$, $p=0.005$, respectively). In septic patients remaining alive during the follow-up of 28 days, the chemotactic response to IL-8 recovered over time (Fig. 6) and exceeded, from the 20th day, the levels observed in the patients without SIRS ($p=0.03$). In this subgroup of patients, a significant difference was noted between the chemotaxis determined by the plasma collected at inclusion and that collected on the 28th day of follow-up ($p=0.005$) (Fig. 7). We further investigate the levels of IL-8 in the plasma from all studied patients. Remarkably, for all collecting points, there was no difference in IL-8 plasma levels between septic and noninfectious SIRS groups.

Figure 5. Chemotaxis activity of neutrophil-like HL-60 cells challenged by septic (n=31), noninfectious SIRS (n=24) and non SIRS (n=11) plasma sampled at study inclusion

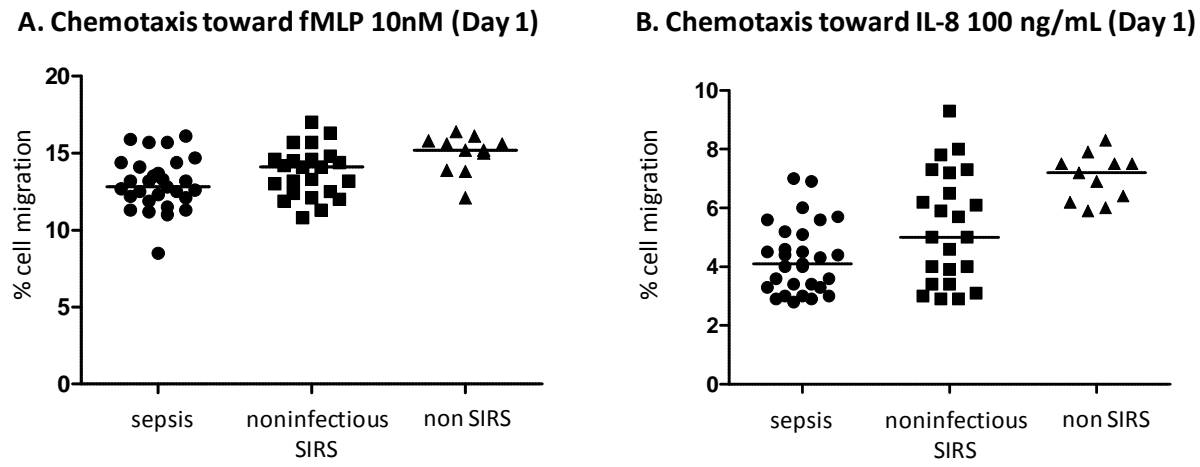


Figure 6. Evolution of IL-8 dependent chemotaxis of neutrophil-like HL-60 cells during the follow up of the 12 septic patients who were alive on the 28th day (n=12)

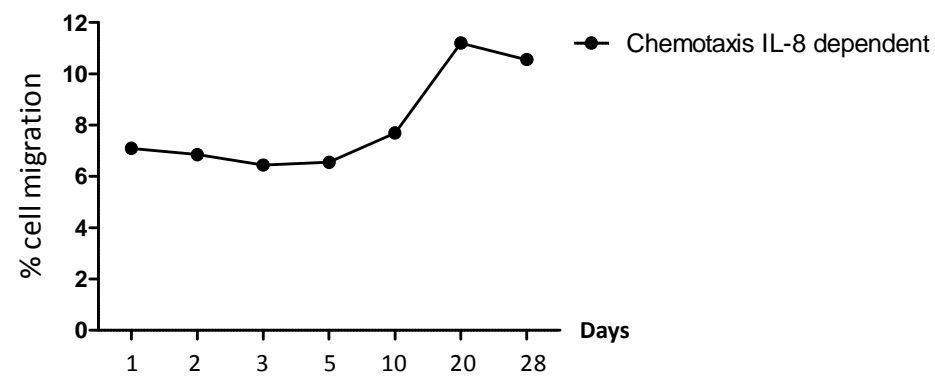
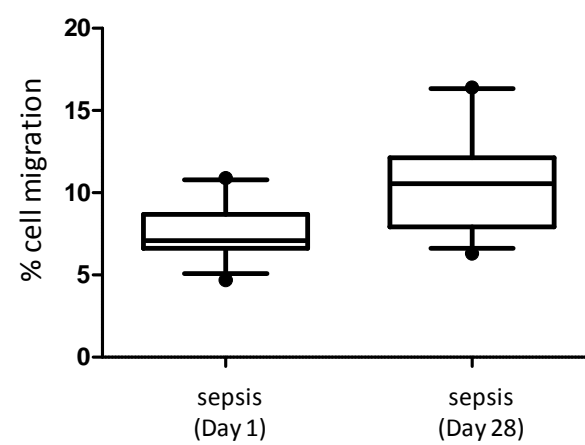


Figure 7. Comparison of IL-8 dependent chemotaxis by neutrophil-like HL-60 cells between days 1 and 28 among septic patients who survived until the 28th day of follow up (n=12)



Mortality

Twenty four patients died during the follow up of 28 days (13 in septic group, 11 in noninfectious SIRS group and none in non SIRS group; $p=0.018$). The 28-day mortality was higher in patients with plasma at inclusion supporting higher opsonic activity after 20' and 50' ($p=0.025$ and $p=0.015$, respectively), and lower chemotactic activity to IL-8 ($p=0.005$). However, both for phagocytosis and for chemotaxis, these findings were not confirmed in the multivariate analysis adjusted for severity (SAPS III and SOFA scores).

Considering the whole sample of patients, a significant correlation was observed between SAPS III values and the phagocytosis determined by the plasma collected at inclusion, both for 20' (CC: 0.390; $p = 0.002$) and for 50' (CC: 0.440; $p < 0.001$) of incubation. Similar results were observed with chemotaxis induced by fMLP (CC: - 0.36; $p = 0.012$) and by IL-8 (CC: - 0.626; $p = < 0.001$).

Discussion

Sepsis describes a complex syndrome resulting from an unbalanced inflammatory response to an infectious challenge. Innate immune responses are altered during sepsis, however the capacity of opsonins and mediators in septic plasma to influence phagocytosis and chemotaxis has been only scarcely investigated. In this study we evaluated the influence of septic plasma on the phagocytic and chemotactic activities of healthy neutrophil-like cells, comparing these findings with those observed when the plasma of patients with noninfectious SIRS and patients without SIRS was used. Using an *in vitro* model, we found that plasma from septic patients enhanced the phagocytic activity of neutrophil-like cells as compared to plasma from noninfectious SIRS and non SIRS controls. Remarkably, the phagocytic activity stimulated by the septic plasma increased over time, from inclusion to day 28, suggesting a dynamic process. On the other hand, septic plasma inhibited the chemotactic activity of neutrophils induced by fMLP and mainly by IL8, even though the chemotactic activity to IL-8 recovered and exceeded the levels from controls during the follow-up of septic survivors.

In a large extend, the interaction between the pro inflammatory and the compensatory anti-inflammatory response syndrome determines the magnitude of tissue damage and organ failure in sepsis (COHEN, 2002). Either in sepsis or in noninfectious syndromes, the unbalanced inflammatory environment can influence neutrophil activity, including the phagocytic ability and the chemotaxis (SIMMS; D'AMICO, 1994; WENISCH *et al.*, 2001; TAVARES-MURTA *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2003; ARRAES *et al.*, 2006). Up to now, discrepant results have been found by

these different authors that investigated the neutrophil functions under inflammatory conditions. Regarding phagocytosis, our results are in agreement with some published data, that showed that neutrophils from septic patients have present an upregulated phagocytic activity (HOFMAN *et al.*, 2000; MARTINS *et al.*, 2003; SCHREINER *et al.*, 2011). However, differently from these authors, we investigated the role influence of the septic plasma over normal neutrophil-like cells. In this regard, there are some evidences that plasma from patients with sepsis exert a profound effect on neutrophil response, stimulating phagocytosis of opsonized zymosan particles (KAUFMANN *et al.*; 2006) and decreasing the oxidative burst by healthy leucocytes (PASCUAL *et al.*, 1998). As to that observed in chemotaxis, a study conducted with septic newborns has shown that fresh plasma transfusion could restore the decreased chemotactic activity of the neutrophils (EISENFELD *et al.*, 1992). An experiment testing the function of neutrophil from septic patients challenged by normal plasma and by plasma from septic individuals could contribute to the understanding of these discrepant findings.

Two other points deserves consideration. First, the alterations in the innate immune response observed in this study seem to be not specific of infection, being largely correlated with the severity of illness. It is has been demonstrated that dysfunctional neutrophil responses precedes nosocomial infections in severely ill patients (STEPHAN *et al.*, 2002). Another aspect concerns to the ongoing behavior of the phagocytosis and chemotaxis observed in the surviving patients with sepsis. Most studies conducted on this field analyzed neutrophils isolated within the first 48 hrs of sepsis, without a long term reevaluation. Conceiving sepsis like a dynamic process, it would be indispensable to analyze the neutrophil functions over time, until clinical recovery or death. On that ground, we showed that that phagocytic ability kept increasing under the influence of plasma sequentially collected during the ongoing sepsis while the chemotactic activity ended up in a recovered neutrophil activity. An initially antagonistic response presented by the phagocytosis and the chemotaxis tended to follow the same direction in the late phases of sepsis. For a better characterization of the long term behavior of these neutrophil responses, and its eventual clinical implications, a longer follow-up is desirable. Finally, we observed a striking increase in the phagocytic activity of neutrophils in three out of the four patients initially classified as noninfectious SIRS that lately became infected (data not shown).

Some limitations of this study deserve to be mentioned. First, since the cultures were positive in 54.8% of the septic patients, some individuals in this group might me misclassified. Second, we used differentiated HL-60 cells to mimic neutrophils. The use of these cells is justified by the need to standardize the experiments and there are many studies showing that HL-60 cells under the treatment with DMSO acquire similar neutrophil functions, although less potent (GALLAGHER *et al.*, 1979; GUY, B. *et al.*, 2000). It has been well demonstrated they can be a good

model to evaluate neutrophil activities under some circumstances (BLAIR; CARBONE; SARTORELLI, 1986; FLECK; ROMERO-STEINER; NAHM, 2005). Furthermore, we tested the influences of some plasma from patients of the three groups over the phagocytic and chemotactic functions of granulocytes obtained from healthy donors and the results were similar to that observed when HL-60 cells were used (data not shown). Third, we were not able to fully investigate the mechanisms responsible for the alterations observed in the neutrophil function when exposed to plasma from septic patients. Finally, the studied groups were unbalanced regarding the severity scores, and this may represent a confounding factor to our results.

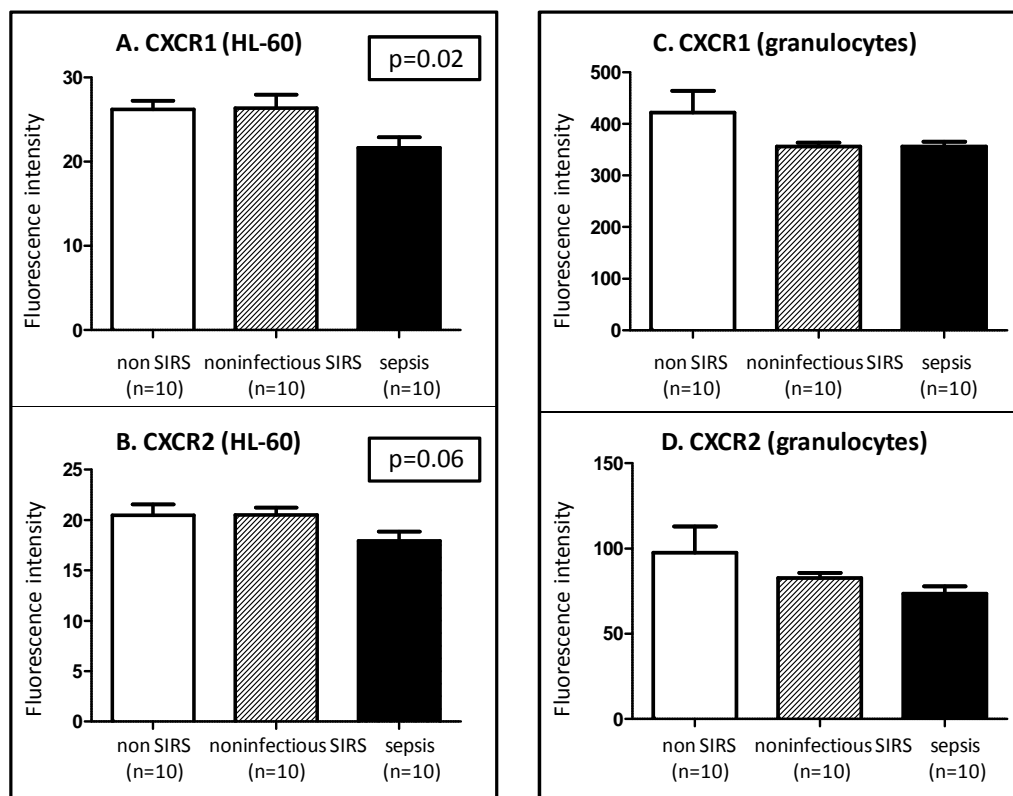
In conclusion, we found that plasma from patients with sepsis significantly modifies the neutrophil chemotactic and phagocytic activities. These alterations progressively change along the sepsis evolution, suggesting a highly dynamic process. The mechanisms involved in these altered responses, their meaning, and the potential opportunities for therapeutic interventions remain to be further investigated.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação das alterações imuno-inflamatórias decorrentes da sepse representa o atual foco de interesse dos estudos conduzidos no Laboratório de Cuidados Intensivos da Universidade de Genebra, com um grande número de trabalhos em andamento ou já publicados. Alguns desajustes de funções como fagocitose, quimiotaxia, degranulação e “*killing*” já foram demonstrados nesses trabalhos, e o estudo do plasma séptico representa um dos subprojetos dessa linha de pesquisa que visa também identificar mediadores que participam e interagem com os diferentes mecanismos da resposta imune inata. Entretanto, trata-se de uma área de pesquisa ainda incipiente no sentido de que, pelo nosso conhecimento, todos os estudos disponíveis na literatura foram conduzidos *ex vivo* na tentativa de compreender fenômenos que ocorrem *in vivo* sob a influência de diferentes moléculas e condições.

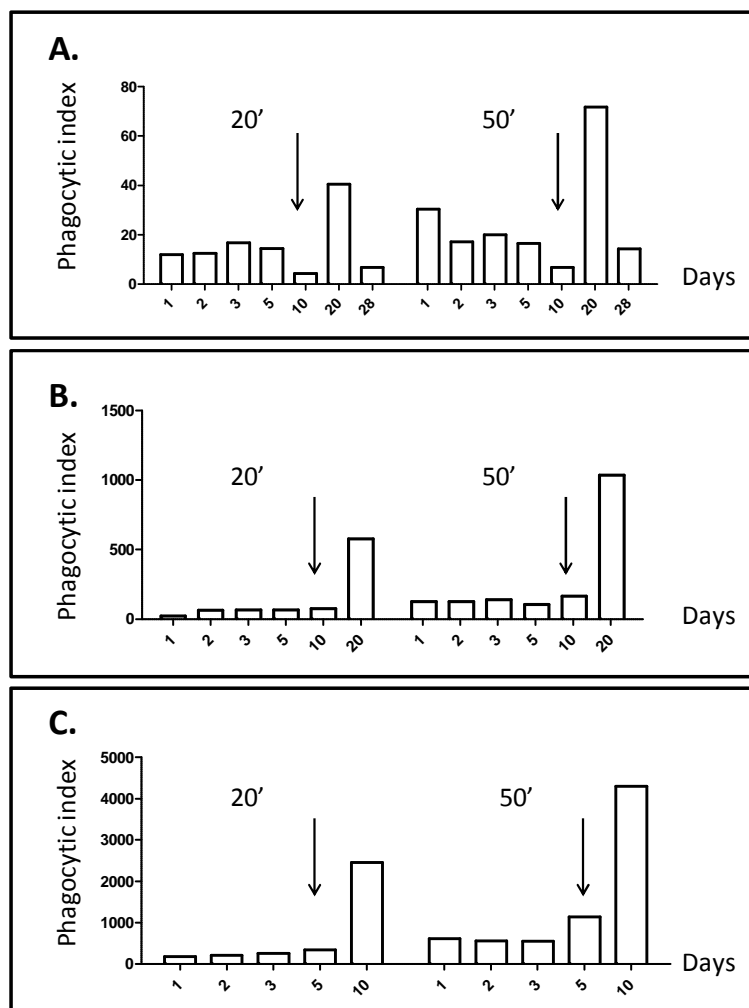
Objetivando a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na inibição da quimiotaxia dependente de IL-8 apresentada por neutrófilos submetidos ao plasma séptico, a expressão dos receptores de IL-8 na superfície celular foi avaliada por meio de citometria de fluxo. Para tanto, foram selecionados aleatoriamente dez amostras de plasma de pacientes representantes de cada um dos três grupos, coletados no momento da inclusão no estudo. Os plasmas selecionados foram incubados com células HL-60 diferenciadas em neutrófilos e com neutrófilos obtidos de um doador sadio. Os resultados encontrados foram interessantes ao apontar uma redução significativa da expressão de CXCR1 e CXCR2 na superfície das células HL-60 expostas aos plasmas sépticos, em comparação com os outros dois grupos de estudo ($p=0,02$ e $p=0,06$, respectivamente) (Fig. 8A e 8B). Os resultados encontrados quando granulócitos de um doador sadio foram utilizados apresentaram a mesma tendência, porém as diferenças não foram significativas (Fig. 8C e 8D). Uma possível explicação para tal achado pode ter sido a utilização de células de apenas um doador e um novo experimento com neutrófilos de diferentes doadores sadios está sendo preparado.

Figure 8. CXCR1 and CXCR1 expression on surfaces of neutrophil-like HL-60 cells and neutrophils from a healthy donor under the influence of septic (n=10), noninfectious SIRS (n=10) e non SIRS (n=10) plasma



Em relação à avaliação da atividade fagocitária, um achado interessante merece ser detalhado nessas considerações. Dentre os quatro pacientes com SIRS não infecciosa que desenvolveram sepse em algum momento do seguimento clínico, três apresentaram um aumento relevante da atividade fagocitária logo após o diagnóstico de infecção (Fig. 9A, 9B e 9C). Tais dados reforçam os presentes resultados que indicam um aumento significativo da atividade fagocitária dos neutrófilos expostos ao plasma séptico.

Figure 9. Longitudinal evaluation of phagocytic index among noninfectious SIRS patients who developed nosocomial infection during the follow-up. Arrows indicate the diagnosis of nosocomial infection



Os resultados do presente estudo, apesar de relevantes, apresentam aplicabilidade clínica limitada devido, em parte, às restrições inerentes aos próprios métodos experimentais utilizados. Eles visam, sobretudo, melhorar o entendimento das alterações induzidas pelo plasma de pacientes sépticos sobre a função de neutrófilos e esclarecer alguns mecanismos envolvidos nesse processo. A nosso ver, este trabalho é meritório por acrescentar novas informações à literatura existente, servindo como direcionamento potencial para futuros estudos que visem não só o maior esclarecimento das alterações do sistema imune inato na sepse, como também a identificação de alvos terapêuticos úteis para pacientes infectados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E. *et al.* p55 Tumor Necrosis Factor Receptor Fusion Protein in the Treatment of Patients with Severe Sepsis and Septic Shock. *JAMA*, v. 277, n. 18, p. 1531-1538, May 1997.

ABRAHAM, E. Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis. *Intensive Care Medicine*, v. 25, p. 556-565, 1999.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Reviews of Immunology*, v. 17, p. 593-623, 1999.

ADEREM, A. Role of Toll-like receptors in inflammatory response in macrophages. *Critical Care Medicine*, v.29, n.7 (Suppl.), p. S16-S18, 2001.

ADEREM, A. Phagocytosis and the Inflammatory Response. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 187 (Suppl. 2), p. S340-S345, 2003.

ALVES-FILHO, J.C. *et al.* The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock*, v. 30, S. 1, p. 3-9, 2008.

AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS / SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE CONSENSUS CONFERENCE, 1991, Chicago. Definitions of sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*, v. 101, n.6, p.1644-1655, Jun. 1992.

ANGUS, D. C. *et al.* Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine*, v.29, n.7, p. 1303-1310, July 2001.

ANNANE, D. *et al.* Effect of Treatment with Low Doses of Hydrocortisone and Fludrocortisone on Mortality in Patients with Septic Shock. *JAMA*, v. 288, n. 7, p. 862-872, Aug. 2002.

ANNANE, D. *et al.* Current epidemiology of Septic Shock – The CUB-Réa Network. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, v. 168, p. 165-172, 2003.

ARRAES, S.M. *et al.* Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. *Blood*, v.108, p. 2906-2913, 2006.

BERNARD, G. R. *et al.* Efficacy and Safety of Recombinant Human Activated Protein C for Severe Sepsis. *The New England Journal of Medicine*, v. 344, n. 10, p. 699-709, Mar. 2001.

BLAIR, O. C.; CARBONE, R.; SARTORELLI, A. C. Differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells: simultaneous determination of phagocytic activity and cell cycle distribution by flow cytometry. *Citometry*, v. 7, p. 171-177, 1986.

BLEUTLER, B.; POLTORACK, A. Sepsis and evolution of the innate immune response. *Critical Care Medicine*, v. 22, n.7 (Suppl.), p. S2-S6, 2001.

BOKOCH, G.M. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood*, v.86, p. 1649-1660, 1995.

BRUN-BUISSON, C. *et al.* Incidence, risk factors and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. *JAMA*, v. 274, p. 968-974, 1995.

BRUN-BUISSON, C. *et al.* EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Medicine*, v.30, p. 580-588, 2004.

CARRIGAN, S. D.; SCOTT, G.; TABRIZIAN, M. Toward Resolving the Challenges of Sepsis Diagnoses. *Clinical Chemistry*, v.50, n. 8, p. 1301-1314, 2004.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, v. 420, p. 885-891, Dec. 2002.

COLLINS, S. J., GALLO, R. C.; GALLAGHER, R. E. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature*, v. 270, p. 347-349, 1977.

DANIKAS, D. D. *et al.* Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 e CD14 antigen expression. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 154, p. 87-97, 2008.

DELLINGER, R. P. *et al.* Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Medicine*, v. 30, n. 4, p. 536-555, 2004.

DELLINGER, R. P. *et al.* Surviving Sepsis: Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Medicine*, v. 34, n. 1, p. 17-60, 2008.

EISENFELD, L. *et al.* Enhancement of neonatal neutrophil motility (chemotaxis) with adult fresh frozen plasma. *American Journal of Perinatology*, v.9, p. 5-8, 1992.

FLECK, R. A.; ROMERO-STEINER, S.; NAHM, M. H. Use of HL-60 cells to measure opsonic capacity of pneumococcal antibodies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 12, n. 1, p. 19-27, Jan. 2005.

FRANÇA, J. L.; VASCONCELLOS, A. C. *Manual para normalização de publicações técnico-científicas*. Belo Horizonte. Editora UFMG, 2008. 255p.

FRIEDMAN, G.; SILVA, E.; VINCENT, J-L. Has the mortality of septic shock changed with time? *Critical Care Medicine*, v. 26, n. 12, p. 2078-2086, Dec. 1998.

FUMEAUX, T.; PUGIN, J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen- DR in monocytes during septic shock. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, v. 166, p. 1475-1482, 2002.

FURZE, R.C.; RANKIN, S.M. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*, v. 125, p. 281-288, 2008.

GALLAGHER, R. *et al.* Characterization of continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, v. 54, p. 713-733, 1979.

GOLDIE, A. S. *et al.* Natural Cytocine Antagonist and Endogenous Antiendotoxin Core Antibodies in Sepsis Syndrome. The Sepsis Intervention Group. *JAMA*, v. 274, p. 172-177, 1995.

GUY, B. *et al.* Comparison of polymorphonuclear cells from healthy donor and differentiated HL-60 cells as phagocytes in an opsonophagocytic assay using antigen-coated fluorescent beads. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 7, n. 2, p. 314-317, Mar. 2000.

HAMMOND, M.E.W. *et al.* IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *The Journal of Immunology*, v.155, p. 1428-1433, 1995.

HILL, H. R. *et al.* Hyperactivity of neutrophil leukotactic responses during active bacterial infection. *J. Clin. Investig.*, v. 53, p. 996-1002, 1974.

HOFMAN, P. *et al.* Increased *Escherichia coli* Phagocytosis in Neutrophils that Have Transmigrated across a Cultured Intestinal Epithelium. *Infection and Immunity*, vol. 68, n.2, p. 449-455, Feb. 2000.

HOFMAN, P. *et al.* *Escherichia coli* necrotizing factor-1 (CNF-1) increases the adherence to epithelia and the oxidative burst of human polymorphonuclear leucocytes but decreases bacteria phagocytosis. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 68, p. 522-528, Oct. 2000.

HOFMAN, P. Molecular regulation of neutrophil apoptosis and potential targets for therapeutic strategy against the inflammatory process. *Current Drug Targets Inflammatory Allergy*, v. 3, p. 1-9, 2004.

HOTCHKISS, R. S. *et al.* Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock and multiple organ dysfunction. *Critical Care Medicine*, v. 27, p. 1230-1251, 1999.

HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *The New England Journal of Medicine*, v. 348, p. 138-150, 2003.

HUGGONET, S. *et al.* Bacteremic sepsis in intensive care: Temporal trends in incidence, organ dysfunction, and prognosis. *Critical Care Medicine*, v. 31, n. 2, p. 390-394, Feb. 2003.

JACOB, C. *et al.* DMSO-treated cells: a model of neutrophil-like cells mainly expressing PDE4B subtype. *International Immunopharmacology*, v. 2, p. 1647-1656, 2002.

JANEWAY, C. A.; MIDZHITOV, R. Introduction: The role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin. Immunol*, v. 10, p. 349-350, 1998.

KATANAEV, V.L. Signal transduction in neutrophil chemotaxis. *Biochemistry*, v.66, p. 351-368, 2001

KAUFMANN, I. *et al.* Polymorphonuclear leucocyte dysfunction syndrome in patients with increasing sepsis severity. *Shock*, v. 26, n. 3, p. 254-261, 2006.

KUTZA, A. S. *et al.* High incidence of active cytomegalovirus infection among septic patients. *Clinical Infectious Diseases*, v. 26, p. 1076-1082, 1998.

LIEN, E.; INGALLS, R. R. Toll-like receptors. *Critical Care Medicine*, vol.30, n.1 (Suppl.), p. S1-S6, 2002.

MACHADO, F. R; MAZZA, B. F. Improving mortality in sepsis: analysis of clinical trials. *Shock*, v. 34, p.54-58, 2010.

MARTIN, G. S. *et al.* The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England Journal of Medicine*, v. 48, n.16, p. 1546-1554, Apr. 2003.

MARTINS, P. S. *et al.* Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock*, v. 20, n. 3, p. 208-212, 2003.

MATULA, G.; PATERSON, P.Y. Spontaneous in vitro reduction of nitroblue tetrazolium by neutrophils of adult patients with bacterial infection. *The New England Journal of Medicine*, v. 285, p. 311-317, 1971.

METNITZ, P. G. *et al.* SAPS 3--From evaluation of the patient to evaluation of the intensive care unit. Part 1: Objectives, methods and cohort description. *Intensive Care Medicine*, v. 31, n. 10, p. 1336-1344, 2005.

MICHIE, H. R. *et al.* Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *The New England Journal of Medicine*, v.318, n. 23, p. 1481-1486, 1988.

MORENO, R.P. *et al.* SAPS 3--From evaluation of the patient to evaluation of the intensive care unit. Part 2: Development of a prognostic model for hospital mortality at ICU admission. *Intensive Care Medicine*, v.31, n.10, p. 1345-1355, 2005.

MUCKART, D. J.; BHAGWANJEE, S. American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions of the systemic inflammatory response syndrome and allied disorders in relation to critically injured patients. *Critical Care Medicine*, v. 25, n.11, p. 1789-1795, Nov. 1997.

MULLER, W.A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunology*, v. 24, p. 327-334, 2003.

MUNFORD, R. S.; PUGIN, J. Normal response to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, v. 163, p. 316-321, 2001.

PASCUAL, C. *et al.* Effect of plasma and LPS on respiratory burst of neutrophils in septic patients. *Intensive Care Medicine*, v. 24, p. 1181-1186, 1998.

PECK, G. *et al.* Serum induced macrophage activation is related to the severity of septic shock. *Inflammation Research*, v. 58, p. 89-93, 2009.

POUSSIN, C. *et al.* CD14-dependent endotoxin internalization via a macropinocytic pathway. *J Biol Chem*, v. 273, p. 20285-20291, 1998.

PUGIN, J. *et al.*, Proinflammatory activity in bronchoalveolar lavage fluids from patients with ARDS, a prominent role of interleukin-1. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, v. 153, p. 1850-1856, 1996.

PUGIN, J. *et al.*, The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Critical Care Medicine*, v. 27, p. 304-312, 1999.

PUGIN, J. Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis. *Novartis Foundation Symposium*, v. 280, p. 21-27, 2006.

RAMET, M. *et al* Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a Drosophila receptor for *E. coli*. *Nature*, v. 416, p. 644-648, 2002.

REDDY, C.R.; STANDIFORD, T.J. Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Current Opinion in Hematology*, v. 17, p. 18-24, 2010.

ROBERTS, P. J. Development, characterization, and subcellular location of DNase activity in HL-60 cells and monocytes. *Blood*, v. 75, n. 4, p. 976-983, Feb. 1990.

ROMERO-STEINER, S. *et al*. Standardization of an opsonophagocytic assay for the measurement of functional antibody activity against *Streptococcus pneumoniae* using differentiated HL-60 cells. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.4, n. 4, p. 415-422, Jul. 1997.

SAKAGUSHI, O.; SAKAGUSHI, S. Alterations of lipid metabolism in mice injected with endotoxin. *Microbiol. Immunol.*, v. 23, n. 2, p. 71-85, 1979.

SALES JÚNIOR, J. A. L. *et al*. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em unidades de terapia intensiva brasileiras. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 18, n. 1, p. 9-17, Janeiro-Março 2006.

SCHIFF, D.E. *et al*. Phagocytosis of gram-negative bacteria by a unique CD14-dependent mechanism. *J Leukoc Biol*, v.62, p. 786-794, 1997.

SCHREINER, L. *et al*. Phagocytosis and digestion of pH-sensitive fluorescent dye (Eos-FP) transfected *E. coli* in whole blood assays from patients with severe sepsis and septic shock. *J Cell Commun Signal*, v.5, p. 135-144, 2011

SHUTO, T. *et al*. Increased responsiveness to TLR2 and TLR4 ligands during dimethylsulfoxide-induced neutrophil-like differentiation of HL-60 myeloid leukemia cell. *Leukemia Research*, v. 31, p. 1721-1728, 2007.

SILVA, E. *et al*. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Critical Care*, v.8, p. R251-R260, 2004.

SIMMS, H. H.; D'AMICO, R. Polymorphonuclear leucocyte dysregulation during the systemic inflammatory response syndrome. *Blood*, v. 83, p. 1398-1407, 1994.

SMITH, J.A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol.*, v. 56, p. 672-686, 1994.

SOGAYAR, A. M. C. *et al.*, for the Costs Study Group-Latin American Sepsis Institute: COSTS-multicenter, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. *Pharmacoeconomics*, v. 26, p. 425-434, 2008.

SOLOMKIN, J.S, COTHA, L.A; BRODT, J.K. Regulation of neutrophil superoxide in sepsis. *Archives of Surgery*, v. 120, p. 93–98, 1985.

STEPHAN, F. *et al.* Impairment of polymorphonuclear neutrophil functions precedes nosocomial infections in critically ill patients. *Critical Care Medicine*, v. 30, p. 315-322, 2002.

TANEJA, R. *et al.* Immature circulating neutrophils in sepsis have impaired phagocytosis and calcium signaling. *Shock*, v. 30, n.6, p. 618-622, 2008.

TAVARES-MURTA, B. M. *et al.* Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Critical Care Medicine*, v. 30, n. 5, p. 1056-1061, 2002.

TELLES, J. M. M. *et al.* Surviving Sepsis Campaign in Brazil. *Shock*, v. 30, p. 47-52, 2008.

TERRITO, M. C.; GOLDE, D. W. Granulocyte Function in Experimental Human Endotoxemia. *Blood*, v. 47, n. 2, p. 539-544, Apr. 1976.

TISSIERES, P. *et al.* Soluble MD-2 is an acute phase protein and an opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood*, v. 111, p. 2122-2131, 2008.

UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of Microbes: Complexity in Action. *Annuals Reviews of Immunology*, v.20, p. 825-852, 2002.

VEUCZIO, R. F., WESTENFELDER, G. O.; PHAIO, J. P. The adherence of polymorphonuclear leukocytes in patients with sepsis. *Journal of Infectious Diseases*, v. 145, p.351–356, 1982.

VINCENT, J-L. *et al.* The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction / failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Medicine*, v.22, n.7, p. 707-710, 1996.

VINCENT, J-L. Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you... *Critical Care Medicine*, v.25, n.2, p. 372-374, Feb. 1997.

VOLK, H. D., REINKE, P.; DOCKE, W. D. Clinical aspects: from systemic inflammation to "immunoparalysis". *Chem. Immunol.*, v. 74, p. 162-177, 2000.

WENISCH, C. *et al.* Effect of Polyclonal Immunoglobulins on Neutrophils Phagocytic Capacity and Reactive Oxygen Production in Patients with Gram-Negative Septicemia. *Infection*, v. 27, n.3, p. 183-185, 1999.

WENISCH, C. *et al.* Assessment of Neutrophil Function in Patients with Septic Shock: Comparison of Methods. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 8, n. 1, p. 178-180, Jan. 2001.

9. APÊNDICES