

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

CAROLINA BRAGA DE RESENDE

**Avaliação da resposta imune inata em pacientes adultos com sepse internados na
Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital das Clínicas da UFMG (HC/UFMG)**

Belo Horizonte

2018

CAROLINA BRAGA DE RESENDE

**Avaliação da resposta imune inata em pacientes adultos com sepse internados na
Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital das Clínicas da UFMG (HC/UFMG)**

Documento apresentado em defesa de tese do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção de título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Vanessa Pinho da Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Jr.

Belo Horizonte, 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por ter me abençoado todos os dias com saúde, fé e alegria para desenvolver este trabalho.

Ao meu **irmão Neto** que sempre esteve ao meu lado me ajudando nos momentos de fraqueza e comemorando comigo as situações de vitória. Razão da minha vida e o principal motivador dos meus trabalhos.

Ao meu orientador professor Dr **Mauro Martins Teixeira** pela oportunidade de desenvolvimento de trabalhos em pesquisa e pela orientação neste trabalho de doutorado!! Muito obrigada!!!

A minha co-orientadora, professora Dra. **Vanessa Pinho**, que me deu a oportunidade de conhecer a pesquisa científica há 10 anos e me fez a cada dia apaixonar por este Universo. Muito obrigada!!!

Ao co-orientador prof. Dr. **Vandack Nobre** que sempre me ajudou durante toda esta jornada acrescentando conhecimento e responsabilidade na execução de pesquisa clínica. Obrigada pela paciência e gentileza em me ensinar a realizar o trabalho.

A minha **mãe Edna** que me ajudou a superar os momentos difíceis clareando os pensamentos e tranquilizando o meu coração. Apesar da distância, se fez muito presente neste período... e E ao meu **Pai José** que me apoiou incondicionalmente neste desafio de me formar no doutorado.

Ao meu noivo **Bernardo** que é companheiro de todos os momentos e o amor da minha vida. Foi motivador na busca deste título.

A **minha irmã** pelo seu carinho e apoio.

Aos demais familiares e amigos pelo amor e torcida.

As colegas, imprescindíveis para realização deste trabalho, **Barbara Maximino e Isabela Borges**. Muito obrigada contribuição na execução dos experimentos, na coleta e análise dos dados e na parceria de trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória do ICB/ UFMG.

Aos colegas do Núcleo Interdisciplinar de Investigação em Medicina Intensiva (NIIMI) pelas sugestões e apoio durante esta jornada.

Agradeço as pessoas que me ajudaram a estudar desde a época de cursinho pré-vestibular.

Meu eterno obrigada: meu irmão José, minha tia Rosangela Resende, colega Larissa leite

e aos professores do cursinho gratuito da igreja Santa Catarina de Labourie por terem confiado em mim... dedico a vocês esta tese!

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APACHE II	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II
DAMPs	Damage associated molecular pattern
E.L.I.S.A.	Enzyme-linked immunosorbent assays
fMLP	n-formil-metionil-leucil-fenilalanina
GPCR	Receptores quimiotáticos acoplados a proteína G
HC	Hospital das Clínicas
ICAM	Moléculas de adesão intercelulares
ILAS	Instituto Latino Americano para Estudos da Sepse
IL6	Interleucina 6
IL1 β	Interleucina 1 β
IL10	Interleucina 10
IL17	Interleucina 17
LPS	Lipopolissacarídeo
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NO	Oxido Nítrico
PAM	Pressão arterial média
PAMPS	Pathogen-associated molecular pattern
PDL-1	Programmed Death-ligand 1
PTX3	Pentraxin 3
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinases
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAPS 3	Simplified Acute Physiology Score 3
SIRS	Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica
SCCM	Society of Critical Care Medicine's
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment Score
TLR	Receptores toll-like
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
QuickSOFA	Sequential Organ Failure Assessment Score
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF α	Fator de necrose tumoral α

LISTA DE QUADROS, FIGURAS E TABELAS

Quadros e figuras do documento - Tese

Quadro 1- Descrição do Escore sequencial de avaliação de disfunção orgânica (SOFA).....	14
Quadro 2 - Comparativo entre as definições Sepsis 2 e Sepsis 3.....	16
Figura 1 - Resposta inflamatória da sepsis.....	19
Figura 2 – Perfil celular e molecular da resposta inflamatória na sepsis.....	20
Figura 3 - Técnica de separação de neutrófilos.....	54
Figura 4 - Ensaio de quimiotaxia em câmara de Boyner.....	55
Figura 5 – Contagem Total de neutrófilos	77
Figura 6 – Quimiotaxia de neutrófilos	77
Figura 7 – Apoptose de neutrófilos	78

Quadros e figuras do documento - Artigo 1

Figura 1: Descrição da análise por pares e seleção dos artigos.....	33
Tabela 1: Análise geral dos textos.....	34
Figura 2: Perfil de quimiotaxia, fagocitose e apoptose do neutrófilo na sepsis	42

Quadros e figuras do documento - Artigo 2

Table 1: Baseline demographic and clinical characteristics of the septic patients ..	66
Figure 1: Analysis of severity scores with mortality and severity of sepsis	68
Figure 2: Sepsis-related survival	69
Figure 3: Chemokine kinetics	70
Figure 4: Sepsis-related chemokines and pentraxin 3 (PTX3)	71
Figure 5: Sepsis-related cytokines	72
Figure 6: Cytokines related to survival and severity of sepsis	73
Figure 7: NETs related to sepsis	74

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	10
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	11
I. INTRODUÇÃO	12
I.1 Sepsis: definições e epidemiologia	12
I.2 Fisiopatologia da sepsis	18
I.3 Atividade do neutrófilo na sepsis: revisão sistemática (Artigo 1).....	22
II. JUSTIFICATIVA	48
III. OBJETIVOS	49
III.1 Objetivo Geral	49
III.2 Objetivos Específicos	49
IV. METODOLOGIA	50
IV.1 Tipo de Estudo	50
IV.2 Sujeitos de pesquisa	50
IV.3 Coleta e análise dos Dados.....	52
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
V.1 Artigo 2	56
V.2 Dados complementares	73
VI. CONCLUSÃO DA TESE	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXOS	83
ANEXO I: Carta de aprovação COEP/ UFMG	83
Anexo II: Carta de submissão da revisão sistemática	84
APÊNDICES	85
APÊNDICE I: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Paciente).....	85
APÊNDICE II: Termo de Consentimento Livre e esclarecido (Familiar)	88
APÊNDICE III: Ficha de Registro Clínico	91

RESUMO:

Introdução: A sepse é definida como uma resposta desregulada do hospedeiro ao agente infeccioso que resulta em aumento de moléculas pró-inflamatórias e estimulação de resposta imune celular. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune inata em pacientes sépticos internados na unidade de cuidados intensivos (UTI) de um hospital universitário. **Métodos:** Foi realizada uma coorte prospectiva em adultos internados na UTI do Hospital das Clínicas da UFMG (HC/UFMG) no período de outubro de 2014 a janeiro de 2018. Os pacientes foram incluídos mediante diagnóstico clínico de sepse e acompanhados durante um ano para análise de sobrevida. Realizou-se análise do perfil de quimiocinas, citocinas, pentraxin-3 e Neutrophil Extracellular Traps (NETs) presentes no soro de pacientes sépticos em três tempos, quais sejam dias: 1(D1), 3(D3) e 7(D7) após a inclusão no estudo. Além disso, foi avaliada a atividade quimiotática de neutrófilos purificados do sangue e estimulados com fMLP, utilizando a câmara de Boyden modificada. A apoptose foi avaliada através da técnica de citometria de fluxo na qual foi avaliada a marcação celular de Anexina V em neutrófilos nos tempos de 3h, 6h, 12h, 22h e 24h. Todas as análises moleculares foram igualmente realizadas com amostras de voluntários que se autodeclararam saudáveis. **Resultados:** Foram incluídos no estudo 81 pacientes, com mediana de 59 (18-97) anos de idade e predomínio do sexo feminino (n=42, 52%). A maior parte dos pacientes era proveniente de internação clínica (62%), e 52% deles tinham choque séptico na inclusão. Dezesesseis pacientes (20%) faleceram ao longo de 28 dias e 32 (40%) pacientes faleceram em um ano de seguimento. Considerando-se todo o grupo de pacientes, observou-se níveis elevados de CXCL10, CXCL8, CCL3 nos três tempos (D1, D3 e D7) analisados em relação a voluntários saudáveis ($p < 0.001$ nas três análises). Os níveis de PTX3 foi elevado no terceiro dia após detecção da sepse quando comparados a controles saudáveis ($p = 0.02$). As citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL10 apresentaram níveis elevados nas amostras dos pacientes com sepse coletadas em D1, comparada a voluntários saudáveis ($p < 0.001$). A IL6 foi a única citocina associada a choque séptico, sendo mais elevada neste subgrupo ($p < 0.001$), e a CXCL10 apresentou níveis significativamente mais elevadas no subgrupo de pacientes que faleceu no seguimento de um ano ($p < 0.001$). Em média, a atividade quimiotática dos neutrófilos dos pacientes com choque séptico apresentou-se 60% menor que a observada em neutrófilos de voluntários saudáveis. Observou-se atraso na apoptose dos neutrófilos de pacientes sépticos em relação aos voluntários saudáveis ($p = 0.04$). Por fim, o nível de DNA/NETs revelou-se aumentado nos pacientes sépticos quando comparados a voluntários saudáveis ($p < 0.001$); esse marcador mostrou-se significativamente elevado no subgrupo com choque séptico ($p = 0.04$) e no subgrupo de pacientes sépticos que faleceu ao longo dos primeiros 7 dias de seguimento no estudo ($p = 0.04$).

Conclusão: Em um grupo de adultos com sepse, observou-se aumento de quimiocinas e citocinas inflamatórias, redução da quimiotaxia, atraso da taxa da apoptose e aumento de NETs. As alterações de aumento de CXCL10, IL6 e NETs e menor atividade quimiotática de neutrófilos ocorreu em pacientes sépticos mais graves e com pior prognóstico.

Palavras-chave: Neutrófilo; Sepse; Coorte; Estudo clínico; Quimiotaxia; Apoptose; NETs.

ABSTRACT

Background: Sepsis is defined as an uncontrolled host response to the infectious agent, which results in a raise of the pro-inflammatory molecules and the stimulation of immune cellular response. The aim of this study was to evaluate the innate immune response in septic inpatients in an intensive care unit (ICU) of a University Hospital.

Methods: This is a prospective cohort study conducted at the adult Intensive Care Unit of Hospital das Clínicas da UFMG from October 2014 to January 2018. Patients were included after the diagnosis of sepsis and monitored up to one-year after the event for survival analysis. The profile of chemokines, cytokines, pentraxin-3 e Neutrophil Extracellular Traps (NETs) contained in septic patients serum were analyzed in three different periods, being 1(D1), 3(D3) e 7(D7) after inclusion in the study. Furthermore, the chemotactic activity of the blood purified and stimulated with fMLP neutrophils was analyzed using Modified Boyden's chamber. All the molecular analysis were equally executed on samples of volunteers who self-declared as healthy.

Resultados: 81 patients were included in the study, with an average of 59 (18-97) years old and predominance of feminine individuals (n=42, 52%). Most of patients came from clinical hospitalization (62%), and 52% of them were diagnosed with septic shock on the inclusion. Sixteen patients (20%) died along 28 days e 32 (40%) patients died along one year. Considering all the patients, high levels of CXCL10, CXCL8, CCL3 during the three different periods (D1, D3 e D7) were observed when analyzed comparing to healthy volunteers ($p < 0.001$). PTX3 levels were increased on the third day after the detection of sepsis when compared to healthy individuals ($p = 0.02$). High levels of IL-6, IFN γ , TNF α and IL10 cytokines were detected on D1 when compared to healthy volunteers. IL6 was the only cytokine associated with septic shock and CXCL10 was the chemokines that presented significantly high levels in the patients subgroup which died along one year ($p < 0.001$). On an average, the neutrophils chemotactic activity of patients with septic shock reduced 60% when compared to the neutrophils of healthy volunteers. Apoptosis was delayed in neutrophils of patients with sepsis when compared to healthy ones ($p = 0.04$). DNA/NETs levels were increased in patients with sepsis when compared to healthy volunteers ($p < 0.001$); whereas the patients with sepsis, this marker was significantly high in the subgroup of patients with septic shock ($p = 0.04$) and in the subgroup that died along 7 days ($p = 0.04$).

Conclusions: In a group of adults with sepsis, there was an increase in inflammatory chemokines and cytokines, reduction of chemotaxis, delayed apoptosis rate and NETs increased. Changes of increase of CXCL10, IL-6 and NETs and chemotaxis reduction was statistically changed in the subgroup more seriously ill patients and with worse prognosis.

Keywords: Neutrophil; Sepsis; Cohort; Clinical trial; Chemotaxis; Apoptosis; NETs.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS:

A ideia inicial deste projeto de pesquisa foi baseada no artigo científico intitulado “Phosphoinositide-3 kinase γ activity contributes to sepsis and organ damage by altering neutrophil recruitment” (Martin EL, e cols. 2010), o qual reforçou o nosso interesse em avaliar a migração e ativação de vias de sinalização do neutrófilo de pacientes com sepse internados na unidade de terapia intensiva (UTI) do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

A partir desta proposta inicial foi dado início o estudo de coorte de pacientes com sepse em outubro de 2014, todos internados no CTI do HC-UFMG. Como o estudo teve início antes da publicação das novas definições de sepse – Consenso Sepse 3 (Seymour CW e cols 2016; Shankar-Hari M e cols, 2016; Abraham E, 2016) utilizamos neste estudo aquelas sugeridas no Consenso Sepse 2 (Levy MM e cols, 2003), conforme descrito nas seções seguintes. Contudo, todos os pacientes incluídos preencheram critérios para as novas definições de sepse, motivo pelo qual a totalidade das análises ter sido feita considerando-se as definições do Sepse 3.

Como atividades gerais de pesquisa, sou membro do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa em Medicina Intensiva – NIIMI. Esse grupo de pesquisa, cuja criação se deu em novembro de 2014 é atualmente coordenado pelo professor Vandack Alencar Nobre Junior. No grupo tenho participado de discussões e estabelecimento de fluxos de pesquisa relacionado aos projetos da área de terapia intensiva, tendo a oportunidade de colaborar com a execução de outros projetos de pesquisa nas suas diferentes fases, conduzidos por colegas pós-graduandos e por outros pesquisadores.

Além disso, em paralelo ao desenvolvimento de pesquisas tenho participado do processo de implantação do protocolo assistencial de atendimento a sepse do HC/UFMG. O objetivo é atingir excelência na detecção e tratamento dos casos de sepse na instituição.

Por fim, durante o doutorado também tenho participado de projetos de pesquisa em modelo animal, especialmente, na análise do processo inflamatório na Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH) aguda, na qual o desenvolvimento de sepse é uma complicação importante.

I. INTRODUÇÃO

I.1 Sepse: definições e epidemiologia

A definição de sepsse sempre foi considerada um desafio para as comunidades científicas e clínicas. Os critérios de diagnósticos, nomenclatura e parâmetros a serem avaliados têm sido foco de discussão desde os anos noventa, quando foi realizada a “Consensus Conference on Sepsis and Organ Failure” e as definições clínicas do quadro de sepsse, sepsse grave e choque séptico foram agrupadas para diagnóstico desta síndrome (Bone RC e cols, 1992). Nesta conferência foram definidos critérios para o diagnóstico da Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), sepsse, sepsse grave e choque séptico (Bone RC e cols, 1992). A partir destas definições foi introduzido o conceito de resposta inflamatória e deixou-se de usar o termo “síndrome séptica”, tendo sido acrescentados os termos: sepsse, sepsse grave, choque séptico e disfunção orgânica.

Considerando-se os critérios vigentes na época, o diagnóstico clínico da sepsse representava um desafio devido à possibilidade de pacientes portadores de condições não infecciosas, como o trauma, também apresentarem o quadro de SIRS. Desse modo, em 2003 outra conferência foi realizada para revisar os critérios lançados em 1991 e propor definições mais claras para o diagnóstico clínico da sepsse. Para tal objetivo, foram incluídos 29 centros participantes provenientes da Europa e América do Norte (Levy MM e cols, 2003). A partir da conferência de 2003 foi estabelecido, então, que o quadro clínico de sepsse grave seria definido pela presença de disfunção orgânica e o choque séptico seria a falência circulatória após reposição volêmica e necessidade de administração de vasopressores para recompor estabilidade hemodinâmica (Levy MM e cols, 2003).

Várias foram as tentativas de mudanças nos critérios de diagnóstico da sepsse devido à baixa especificidade do uso dos critérios utilizados para SIRS em identificar os pacientes com essa síndrome. Na mesma época da conferência de 2003, houve uma preocupação com a sensibilidade das ferramentas utilizadas para identificar pacientes sépticos uma vez que o início precoce do tratamento com antibiótico é associado a melhor desfecho clínico (Kumar, A e cols, 2006). Dessa forma, o uso de marcadores biológicos como a procalcitonina, proteína C reativa, além de sinais como a presença de hiperglicemia ou aumento de edema causado pela vasodilatação sistêmica foram discutidos para comporem os critérios de diagnóstico desta doença. Porém, a falta de dados mais consistentes e de um consenso entre as sociedades de cuidado intensivo, as

definições de sepse grave e choque séptico foram mantidas sem a inclusão do uso de níveis de procalcitonina ou alterações de glicemia como critérios de diagnóstico.

A modificação mais recente dos critérios para diagnóstico da sepse ocorreu em 2016, no 45º Congresso da Society of Critical Care Medicine's (SCCM), em Orlando, Flórida (EUA) no qual foram apresentadas as novas Definições de Sepse, publicadas no JAMA (The Journal of American Medicine Association) (Seymour CW e cols 2016; Shankar-Hari M e cols, 2016; Abraham E, 2016). As principais modificações foram relacionadas à inclusão do escore Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA) (**Quadro 1**) e níveis de lactato para diagnóstico da sepse (Seymour CW e cols 2016; Shankar-Hari M e cols, 2016; Abraham E, 2016). Em publicação recente, foi demonstrado que o escore SOFA tem maior valor preditivo para mortalidade hospitalar do que os critérios utilizados para a SIRS que eram amplamente utilizados para diagnóstico da sepse (Seymour CW e cols 2016; Shankar-Hari M e cols, 2016; Abraham E, 2016). A partir dessas publicações, a sepse passaria a ser diagnosticada em pacientes que apresentassem variação de dois pontos no escore SOFA na presença de infecção, suspeita ou confirmada. Choque séptico, por sua vez, passou a ser definido pela presença de lactatemia maior ou igual a dois (mmol/l) com necessidade do uso de vasopressores.

Devido à relativa complexidade do SOFA e à sua utilização restrita à UTIs até então, foi proposta a introdução qSOFA (quick Sequential Organ Failure Assessment Score – escore sequencial de avaliação de disfunção orgânica) como possível escore simplificado de avaliação de risco para piora clínica (Seymour CW e cols 2016; Shankar-Hari M e cols, 2016; Abraham E, 2016).

Akash Gupta e cols (2018) publicaram um estudo de análise retrospectiva de aplicação do qSOFA e SIRS como critério de detecção da sepse e demonstrou que o qSOFA pode ser melhor para detectar a sepse do que a SIRS. A escala de coma de Glasgow foi a variável clínica mais importante dentre os critérios do qSOFA associada a risco de piora clínica (Akash Gupta e cols, 2018).

Quadro 1- Descrição do Escore sequencial de avaliação de disfunção orgânica (SOFA):

	0	1	2	3	4
Respiração PaO₂/ FiO₂	>400	<400	<300	<200	<100
Coagulação Plaquetas 10³/mm³	>150	>150	<100	<50	<20
Hipotensão Cardiovascular	PAM >70	PAM <70	Dopamina <5 ou Dobutamina em qualquer dose	Dopamina >5, Epinefrina ≤ 0.1 ou Norepinefrina ≤ 0.1	Dopamina >15, Epinefrina > 0.1 ou Norepinefrina > 0.1
Fígado Bilirrubina mg/dL	<1.2	1.2-1.9	2.0-5.9	6.0-11.9	>12.0
Escala de Coma de Glasgow	>14	13-14	10-12	6-9	<6
Creatinina e Débito urinário	<1.2	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9 <500	>5 ou <200

Fonte: Revista Brasileira de Cardiologia. Tabela adaptada.

Dessa forma, os conceitos e critérios clínicos publicados em 2016 (Seymour CW e cols 2016; Shankar-Hari M e cols, 2016) para avaliação do quadro de sepse foram:

Sepse: disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada a uma infecção (Seymour CW e cols 2016).

Critério clínico para a Sepse: suspeita ou certeza de infecção e um aumento agudo de ≥ 2 pontos no SOFA em resposta a uma infecção (representando disfunção orgânica) (Seymour CW e cols 2016).

Choque Séptico: sepse acompanhada por profundas anormalidades circulatórias e celulares/metabólicas capazes aumentar a mortalidade substancialmente (Shankar-Hari M e cols, 2016).

Critério clínico para Choque Séptico: sepse associado a necessidade de vasopressor para elevar a pressão arterial média acima de 65 mmHg e lactato > 2 mmol/L (18 mg/dL) após reanimação volêmica adequada (Shankar-Hari M e cols, 2016).

O termo sepse grave foi descartado, e sugeriu-se o abandono da definição de SIRS para uso na prática clínica em pacientes adultos com suspeita de sepse. Assim, é possível fazer um breve comparativo entre os conceitos de sepse considerados antigos (1991 e 2001) e os novos conceitos do sepse 3 (**Quadro 2**) (Seymour CW e cols 2016; Shankar-Hari M e cols, 2016).

Quadro 2: Comparativo entre as definições Sepsis 2 e Sepsis 3

	Definições antigas	Novas Definições (Sepsis 3)
Sepsis	<p>SIRS (considera-se 2 ou mais critérios abaixo):</p> <ul style="list-style-type: none"> -Temperatura > 38 °C ou < 36 °C. -Frequência cardíaca > 90 bpm. -Frequência respiratória > 20 irpm ou PaCO₂ < 32 mmHg. -Leucócitos totais < 4,000 ou > 12,000, ou > 10% de bastões. <p>Associado a Suspeita de Infecção</p>	<p>Suspeita e/ou Documentação de Infecção</p> <p>Associado a</p> <p>Aumento de 2 pontos ou mais no escore de SOFA.</p>
Sepsis Grave	<p>Quadro de Sepsis</p> <p>Associado a</p> <ul style="list-style-type: none"> -Pressão arterial sistólica < 90mmHg ou Pressão arterial média (PAM) < 65mmHg. - Lactato > 2.0 mmol/L - RNI > 1.5 ou TTP > 60 s - Bilirrubina > 2.0 mg/dL. -Débito Urinário < 0.5 ml/Kg/h por 2h. -Creatinina > 2.0 mg/dL -Plaquetas < 100.000. -SaO₂ < 90% em ar ambiente. 	<p><u>Definição extinta</u></p>
Choque Séptico	<p>Quadro de Sepsis Associado a Manutenção da Hipotensão após reanimação volêmica adequada.</p>	<p>Quadro de Sepsis</p> <p>Associado a</p> <p>Necessidade de uso de vasopressores para manter PAM > 65mmHg</p> <p>E</p> <p>Lactato > 2 mmol/L após reanimação volêmica.</p>

Apesar das várias tentativas em se ajustar terminologia e parâmetros clínicos associados a sepsis, o diagnóstico da sepsis continua sendo um desafio no atendimento clínico intra-hospitalar devido às variáveis clínicas que cada paciente apresenta quando tem o quadro de infecção sistêmica.

A sepsis é considerada a décima causa de morte nos Estados Unidos da América (EUA) representando 10% das admissões em unidades de terapia intensiva neste país

(Derek C & Poll T, 2013). O número de casos nos EUA é superior a 750.000 casos por ano, porém, há variações no que diz respeito ao diagnóstico clínico da sepse grave, e isso pode impactar no número de registro dos casos (Derek C & Poll T, 2013). A pneumonia está entre as principais causas de sepse, seguida de infecção abdominal e do trato urinário nos EUA (Angus DC e cols, 2001; Ranieri VM e cols, 2012). Dentre as bactérias gram-positivo, o *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus pneumoniae* predominam como principais etiologias e dentre as gram-negativo, predominam a *Escherichia coli* e a *Klebsiella sp* (Angus DC e cols, 2001; Vincent JL e cols, 2009).

No Brasil o trabalho de Sales JAL e cols (2006) realizado em unidades de terapia intensiva (UTI) demonstrou que a incidência de sepse grave é de 29,6% e de choque séptico em 50,8% dos casos registrados. Neste mesmo estudo, a mortalidade relacionada aos quadros se mantém em 34,4% e 65,3% por sepse grave e choque séptico, respectivamente (Sales JAL e cols, 2006). É importante destacar que a mortalidade global por sepse em UTI do país foi de 46,6% (Sales JAL e cols, 2006). Os principais focos de infecção relacionado a sepse no Brasil são o pulmonar, intra-abdominal e urinário e o foco infeccioso se relaciona com a gravidade da síndrome (ILAS, 2016; Kaukonen KM, e cols 2014). Além disso, o grupo de bactérias gram-negativo representam a maior proporção de agente e infecção fúngica com 5% dos casos de sepse grave e choque séptico em UTIs do Brasil (Sales JAL e cols, 2006).

Além da alta taxa de mortalidade causada pela sepse grave e choque séptico, estudos realizados no sul do país em unidades de emergência e urgência demonstraram alto custo financeiro para rede de saúde com valores acima de três milhões de reais por ano (Barreto MF e cols, 2016) e o custo médio por paciente de 21 mil reais (Sogayar AM e cols, 2008).

Em trabalho recente realizado pelo Instituto Latino Americanos de sepse (ILAS) "SPREAD - Sepsis Prevalence Assessment Database" no qual foi realizado uma análise multicêntrica de prevalência da sepse foi demonstrado uma prevalência de 29,6% o que corresponderia a 1/3 dos leitos de UTI do país ocupados com pacientes com sepse grave e choque séptico. Além da prevalência, o estudo destaca uma letalidade global de 55% e mortalidade na região Sudeste de 51,2% e essa letalidade é maior do que em países desenvolvidos (Lancet Infect Dis, 2017).

A partir desse contexto de altas taxas de incidência mundial da sepse, essa síndrome foi incluída pela Organização mundial de Saúde (OMS) como prioridade de

saúde pública e por isso, cada vez mais busca-se por uma melhor compreensão da fisiopatologia da sepse para atingir melhor manejo clínico dos sinais e sintomas relacionados a sepse.

I.2 Fisiopatologia da sepse

A sepse é definida como uma resposta do hospedeiro ao agente infeccioso, o qual pode ser bactérias, vírus ou fungos, e é caracterizada por inflamação sistêmica desregulada que resulta em alteração hemodinâmica grave, assim como em disfunção de outros sistemas orgânicos. A disfunção orgânica é evidenciada por sinais como a hipoperfusão tecidual, acidose láctica, oligúria e presença de alterações cerebrais como a confusão aguda que ocorrem devido ao perfil fisiopatológico desta síndrome (Levy MM e cols, 2003; Balk RA, 2000).

A instalação e a intensidade da resposta do hospedeiro ao agente infeccioso dependem de alguns fatores como doença de base, idade, fatores genéticos, estado nutricional e imunológico (Singer M e cols, 2004; Cohen J, 2002). Desta forma, o estado clínico característico de sepse pode variar conforme condições e características do paciente e isto impacta no prognóstico relacionado ao quadro de sepse.

Em condições clínicas em que o paciente apresenta sistema imune sem comprometimento prévio conhecido, o paciente com sepse desenvolve uma cascata de eventos imunológicos resultante da ativação de vários tipos celulares e liberação de moléculas pró e anti-inflamatórias envolvendo a ativação da resposta imune inata e adaptativa. Neste contexto, ocorre a instalação de um estado de hiperinflamação na fase inicial da interação celular com o agente infeccioso, seguida por uma fase de hiporesponsividade imune (Balk RA, 2000; James D Faix, 2013) (**Figura 1**).

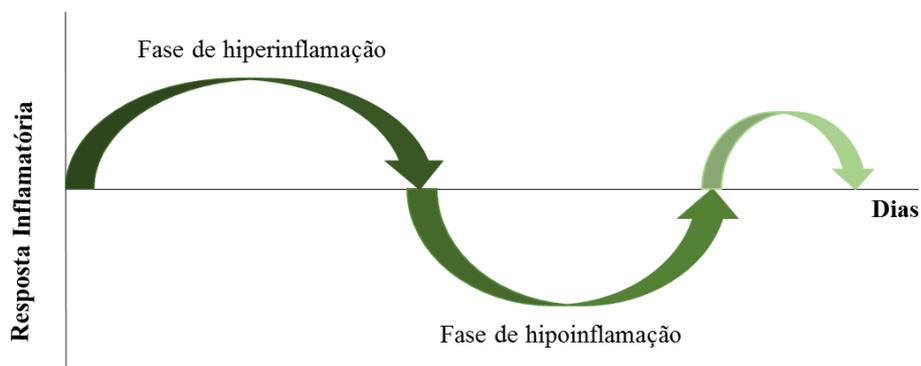


Figura 1- Resposta inflamatória da sepse. Sepse caracterizada por fase de hiperinflamação evidenciado por liberação de moléculas pró e anti-inflamatória (citocinas e quimiocinas) e ativação excessiva de células de defesa. Fase de hipoinflamação definida pela redução de resposta imune ao combate do agente infeccioso. Figura traduzida e adaptada de: James D Faix. *Biomarkers of sepsis. Critical Reviews Clinical Laboratory Science.* (2014).

Na fase de hiperinflamação, o paciente apresenta uma resposta inflamatória para controle da invasão bacteriana de maneira disseminada através da liberação de diversos mediadores inflamatórios como as citocinas e quimiocinas (Singer M e cols, 2006; James D Faix, 2013).

Há diversos trabalhos que demonstraram o aumento dos níveis de citocinas relacionadas a inflamação na sepse, exemplo, é o trabalho conduzido por Bozza e cols (2007) que evidenciou o aumento de IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, MCP-1 e fator de necrose tumoral α (TNF α) em pacientes que tinham choque séptico. O aumento dessas citocinas foram associadas a disfunção de órgãos e cinco dessas citocinas, quais sejam: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8 and MCP-1 apresentaram níveis aumentados em pacientes sépticos que evoluíram a óbito (Bozza, F e cols, 2007).

A partir desse cenário científico de pesquisas relacionadas a inflamação que ocorre na sepse, o aumento desregulado dos níveis plasmáticos de citocinas, como o (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 β (IL-1 β), tem sido associado a um pior prognóstico clínico por causa de uma hiporresponsividade secundária a hiperativação de células de defesa e sistemas como, por exemplo, o sistema do complemento (Singer M e cols, 2004; Cohen J, 2002; Derek CA e cols, 2013). Nessa fase de hiperinflamação, o reconhecimento dos patógenos pelos macrófagos, neutrófilos e células dendríticas ocorre através dos chamados Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs, do inglês do inglês Pathogen-Associated Molecular Pattern) que estão presentes em

microrganismos e, neste caso, circulam na corrente sanguínea dos pacientes (**Figura 2**) (Tom van der Poll, 2013; James DF, 2013).

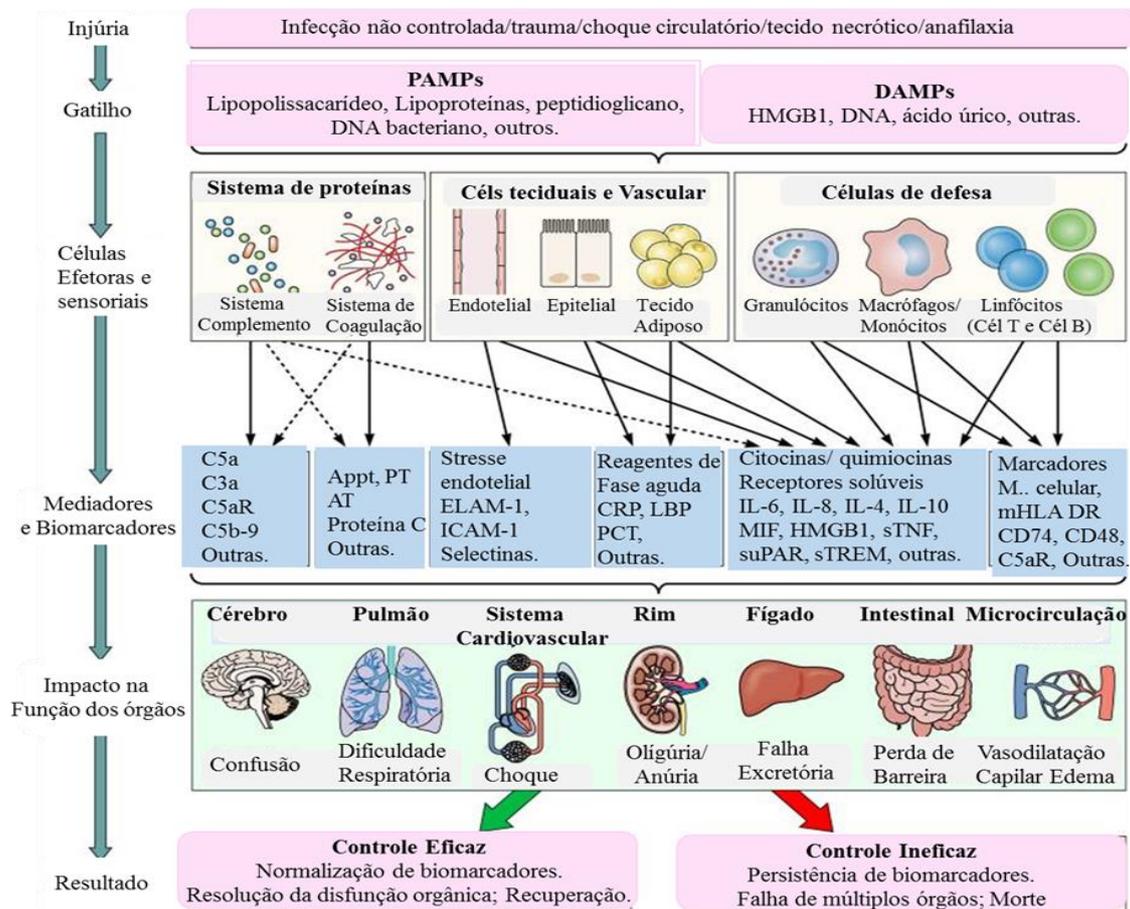


Figura 2 – Perfil celular e molecular da resposta inflamatória na sepse. A injúria ocasiona a liberação de moléculas que são reconhecidas e ativam células do endotélio, linfócitos ou sistemas como do complemento e de coagulação. A ativação celular acarreta liberação de mediadores que causam prejuízos na função de órgãos. Por fim, todo este processo resulta em produção de biomarcadores ou acarreta falha de múltiplos órgãos. Figura traduzida e adaptada de: Konrad R. *New Approaches to Sepsis: Molecular Diagnostics and Biomarkers*. Clinical Microbiology Reviews (2012).

A partir do reconhecimento de antígeno instala-se uma cascata de ativação do sistema de complemento, sistema de coagulação, ativação de células endoteliais e ativação de células de defesa como neutrófilos e linfócitos T e B (Konrad R e cols, 2012). Todo este processo de ativação celular resulta na liberação de altas concentrações de diversas moléculas pró-inflamatórias que vão acarretar em alterações orgânicas no

paciente séptico (Konrad R e cols, 2012; Hotchkiss RS & Karl IE, 2003). Dessa forma, o paciente apresenta sinais de alteração do nível de consciência, disfunção respiratória, renal e hepática e, também, vasodilatação periférica com queda de pressão arterial sistêmica (Konrad R e cols, 2012).

A resposta instalada nesta fase de “hiperativação” apresenta como principal característica a desregulação e por isso ocorre uma disfunção de atividade celular. Leucócitos que têm a capacidade de eliminar o agente agressor como, por exemplo, os neutrófilos, passam a apresentar alterações em seus mecanismos antimicrobianos devido à hiperativação caracterizada por alta taxa de expressão de receptores relacionados a resposta infamatória e liberação citocinas.

E relacionado a esta fase, uma importante linha de investigação tem sido o estudo da liberação das Neutrophil Extracellular Traps (NETs) pelos neutrófilos na sepse. As NETs são fibras de cromatina liberadas por neutrófilos revestidas por proteases (incluindo elastase) e outras moléculas antimicrobianas (como as histonas), e que podem ser tóxicas para a célula hospedeira (Phillipson M; Kubes P; 2011). A liberação de NETs pode acontecer em três formas: através de um mecanismo vesicular; podem ser liberadas por meio da lise celular; e as NETs também podem ser liberadas pelas mitocôndrias, mas o processo ainda permanece pouco definido na literatura (Pilszczek FH e cols, 2010. Marcos V e cols, 2010. Fuchs TA e cols, 2007. Youse S e cols, 2008. Youse S e cols, 2009. Wang Y e cols, 2009).

As NETs foram associados ao quadro de disfunção orgânica da sepse e também foi descrito pelas suas propriedades de controle da invasão bacteriana em modelo experimental de sepse (Czaikoski PG e cols 2016). Em estudo de análise clínica das NETs, Azzouz A e cols, (2018) demonstraram que o controle bacteriano realizado pelo sistema do complemento pode ser prejudicado na presença de NETs e atividade bactericida realizada diretamente por estas fibras parece não ser significativa em condições de infecção bacteriana.

A partir do exposto, a compreensão dos mecanismos relacionados à fase de hiperinflamação com análise da resposta inflamatória e da resposta do neutrófilo torna-se primordial para o melhor manejo clínico dessa síndrome uma vez que a detecção precoce e o tratamento rápido são as principais estratégias para redução de mortalidade relacionada a sepse. Realizou-se pesquisa sistemática de trabalhos científicos que abordaram os eventos relacionados à atividade do neutrófilo na sepse, e a partir dos dados encontrados idealizamos em seguida um estudo original de avaliação da imunidade inata

em pacientes sépticos.

I.3 Atividade do neutrófilo na sepse: revisão sistemática (Artigo 1)

Atividade do neutrófilo na sepse: uma revisão sistemática

Carolina Braga Resende^{1,2}, Isabela Borges^{1,2}, Rafael Carneiro^{1,2}, William Antônio Gonçalves³, Barbara Maximino Rezende³, Vanessa Pinho³, Vandack Nobre^{1,2}, Mauro Martins Teixeira³.

Resumo

Introdução: O neutrófilo é uma importante célula na defesa do organismo contra infecções, atuando na primeira linha de controle de microrganismos. Há evidências de que a função dessa célula se encontra alterada em pacientes com sepse.

Métodos: Esta revisão sistemática teve como objetivo destacar os principais achados científicos sobre a função do neutrófilo na sepse, oriundos de estudos clínicos e experimentais publicados nos últimos 10 anos. Realizou-se busca nas bases BVS e PUBMED, e os textos publicados entre janeiro de 2007 e maio de 2017, em português, inglês e espanhol foram incluídos na pesquisa. A análise para seleção dos artigos foi realizada por dois avaliadores (CB e IB) em formato independente.

Resultados: Encontrou-se um total de 233 artigos, sendo que a busca no Pubmed identificou 87 artigos e no BVS 108 artigos. Oitenta e dois artigos eram comuns às duas bases de dados utilizadas na pesquisa bibliográfica, restando 151 artigos. Desses, após análise de título, resumo e texto, 19 artigos foram considerados elegíveis para esta revisão sistemática. Como resultados gerais os estudos detectaram redução da capacidade de migração e retardo na apoptose de neutrófilos. Não houve consenso, no entanto, nos achados de atividade fagocítica, dado que dois estudos demonstraram redução da fagocitose e um único trabalho demonstrou que não há diferença da atividade fagocítica na sepse quando comparada à neutrófilos de pessoas saudáveis. Por fim, alguns estudos destacaram a análise de moléculas solúveis no sangue que pudessem se associar à fisiopatologia da sepse, como por exemplo, o pentraxin 3 (PTX3). Porém a diversidade de moléculas solúveis detectadas em amostras de sangue de pacientes com sepse limita a definição de uma molécula como melhor marcador de gravidade e mortalidade na sepse.

Conclusão: Neutrófilos de pacientes com sepse ou provenientes de animais com sepse apresentam redução de quimiotaxia, atraso na apoptose e provável alteração na atividade

fagocítica. O melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nesses distúrbios em pacientes com sepse e o seu eventual tratamento poderão contribuir para melhora do prognóstico em pacientes com sepse.

Palavras-chave: Neutrófilo; Sepse; Estudo clínico; Marcadores clínicos; Recrutamento de neutrófilos; Ativação de neutrófilos; Tratamento; Revisão sistemática.

Introdução

A sepse é definida como uma resposta desregulada do hospedeiro a um agente infeccioso, com disfunção de um ou mais sistemas orgânicos. A disfunção orgânica observada na sepse é evidenciada por diferentes sinais, como hipoperfusão tecidual, acidose láctica, oligúria e presença de alterações cerebrais como a confusão aguda que são contemplados no escore SOFA para diagnóstico dessa síndrome (Seymour CW e cols 2016; Shankar-Hari M e cols, 2016; Abraham E, 2016).

Na sepse ocorre uma cascata de eventos resultantes da resposta imune inata e adaptativa, caracterizada por ativação de vários tipos celulares e liberação de moléculas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Observa-se estado de predominante hiperinflamação na fase inicial da sepse, resultante a interação celular com o agente infeccioso, que é seguido por uma fase de hiporesponsividade imune (Balk RA, 2000; James DF, 2013).

Os neutrófilos são as primeiras células a atravessarem o epitélio vascular para atingir o sítio de infecção (Murphy K e cols, 2010). As quimiocinas CXCL1, CXCL2, leucotrieno B4 e CXCL8 liberadas nesta fase atuam no rolamento de leucócitos através da indução de ligação estável entre moléculas de adesão, gerando um gradiente de concentração que estimula o processo de transmigração de neutrófilos da circulação para o local em que ocorre a infecção (Furze RC, Rankin SM, 2008). Há evidências de que, na sepse, a resposta dos neutrófilos pode ser ineficaz, acarretando comprometimento da sua atividade em eliminar o agente infeccioso (Alves JC e cols, 2010; Alves JC e cols 2008; Alves JC e cols 2009; Santos FR e cols, 2007; Benjamim CF e cols, 2000). Essas alterações podem ser parcialmente explicadas pelo estado de hiperinflamação decorrente da liberação exacerbada de citocinas e quimiocinas no sangue, com ativação disseminada de receptores *toll-like* (TLR-2, TLR-4 e TLR-9) por bactérias ou seus produtos (Alves JC e cols, 2008). Acredita-se ainda que alterações em vias de sinalização expliquem parte da

disfunção dos neutrófilos na sepse, e o seu entendimento poderia servir de base para criação de fármacos específicos para o tratamento dessa condição.

Diante do exposto, esta revisão sistemática teve como objetivo destacar os principais achados científicos sobre a atividade do neutrófilo na sepse, a partir de estudos clínicos e experimentais publicados nos últimos 10 anos.

Métodos

Realizou-se pesquisa bibliográfica nas bases de dados BVS utilizando-se os seguintes descritores e formato: (("Neutrophil Activation" OR "Activación Neutrófila" OR "Ativação de Neutrófilo" OR "Neutrophil Infiltration" OR "Infiltración Neutrófila" OR "Infiltração de Neutrófilos" OR "Células LE" OR "Leucócitos Polimorfonucleares" OR "LE cells" OR "Polymorphonuclear leukocytes")) OR (ti:(Neutrophils OR Neutrófilos)) OR (mh:(Neutrophils OR Neutrófilos))) AND ((ti:(Sepsis OR Sepse OR Sepsia OR Sépsis OR Septicemia OR Piemia OR Pioemia)) OR (mh:(Sepsis OR Sepse OR Sepsia OR Sépsis OR Septicemia OR Piemia OR Pioemia))) AND ((ti:(Biomarkers OR Biomarcadores OR Marcadores OR Experimental OR Bookmark)) OR (tw:("Clinical Trial" OR "Ensayo Clínico" OR "Ensaio Clínico" OR "Clinical Study" OR "Estudio Clínico" OR "Estudo Clínico" OR "Estudo de Intervenção" OR "Estudos de Intervenção" OR "Estudio de Intervención" OR "Estudios de Intervención" OR "Intervention Study" OR "Intervention Studies"))) OR (mh:(Biomarkers OR Biomarcadores OR Marcadores OR Experimental OR Bookmark)))) AND (la:("en" OR "es" OR "pt").

Para a pesquisa via Pubmed, utilizou-se os seguintes descritores: (((((((("Neutrophil Activation"[Title/Abstract] OR "Neutrophil Infiltration"[Title/Abstract])) OR "Neutrophils"[Title]) OR ((("Neutrophil Activation"[Mesh:noexp]) OR "Neutrophil Infiltration"[Mesh:noexp]) OR "Neutrophils"[Mesh:noexp]))) AND (((("Sepsis"[Title] OR Septicemia[Title] OR Piemia[Title] OR Pioemia[Title])) OR "Sepsis"[Mesh:noexp]))) AND (((("Clinical Trial"[Title/Abstract] OR "Clinical Study"[Title/Abstract])) OR "Biomarkers"[Title]) OR ((("Biomarkers"[Mesh:noexp]) OR "Clinical Trial"[Publication Type:noexp]) OR "Clinical Study"[Publication Type:noexp])).

Foram incluídos estudos publicados entre janeiro 2007 e maio de 2017, nos idiomas ou em português, inglês e espanhol. A seleção dos artigos foi realizada por dois avaliadores (CB e IB) independentes, após discussão e concordância dos seguintes critérios de elegibilidade: todos os artigos deveriam ser textos originais; na avaliação por

título, a função do neutrófilo teria que ser evidente através da identificação do nome, função ou qualquer menção direta a análise desta célula; na fase de avaliação do resumo a abordagem da atividade direta do neutrófilo no contexto de doença da sepse clínica ou experimental deveria ser contemplada; por fim, os textos analisados na íntegra deveriam ter resultados com descrição da atividade do neutrófilo na sepse experimental ou clínica. Em todas as fases, nos casos de discordância entre os pares sobre inclusão ou exclusão de um determinado artigo, foi acionado um terceiro avaliador para desempate. Foram excluídos todos os protocolos (*eg, guidelines*) e revisões, e um artigo não foi encontrado para leitura na íntegra resultando na sua exclusão.

Resultados

1.1 Descrição e características dos estudos incluídos

Encontrou-se um total de 233 artigos, sendo que a busca no Pubmed identificou 87 artigos e no BVS 146 artigos. Oitenta e dois artigos eram comuns nas duas bases de dados utilizadas na pesquisa bibliográfica. Portanto, 151 artigos restantes foram encaminhados para análise de título. Nesta fase, foram excluídos 71 artigos que não faziam descrição direta do neutrófilo ou sua atividade. Na etapa seguinte, de leitura dos resumos, foram excluídos mais 55 artigos, e na leitura do texto completo foram excluídos quatro artigos, por não contemplarem os critérios de análise direta da atividade do neutrófilo na sepse. Por fim, nesta fase, um artigo não foi encontrado para leitura na íntegra, sendo, portanto, excluído. Totalizou-se a exclusão de 214 artigos nas diferentes etapas. Desta forma, ao final das leituras em formato independente e por pares, obteve-se o total de 19 artigos que contemplavam todos os itens referenciados (**Figura 1**).

Os artigos foram agrupados inicialmente em estudo do tipo experimental (2), experimental e clínico (3), clínico (12), ou ensaio clínico (2). Todos os trabalhos selecionados foram publicados na língua inglesa (**Tabela 1**).

Na análise dos textos observou-se que os estudos tiveram como foco de análise a capacidade de quimiotaxia, a fagocitose ou a apoptose do neutrófilo. Em todos os estudos, experimentais ou clínicos, os autores buscaram identificar moléculas de membrana celular, vias de sinalização intracelular ou tratamentos que pudessem alterar essas vias de ação do neutrófilo.

1.2 Tipos de testes realizados nos diferentes estudos

Migração ou quimiotaxia neutrofílica

Nove artigos contemplaram a análise da migração dos neutrófilos (**Figura 2**), tendo como foco de estudo a presença ou ausência de moléculas envolvidas na alteração direta da capacidade migratória do neutrófilo ou tratamentos e análise de moléculas solúveis no plasma relacionadas indiretamente na migração desta célula. Em todos esses estudos, foi detectada redução da capacidade migratória em células provenientes de modelos de experimentação animal ou de humanos com sepse (Gurleyik G e cols, 2007; Martin EL e cols, 2010; Wang JF e cols, 2015; Schmidt EP e cols, 2012; Souto FO e cols, 2010; Xu R e cols 2015; Demaret J e cols 2015; Blom C e cols, 2015; Ubagai T e cols, 2014; Berger C e cols, 2013).

Martin e cols avaliaram a expressão das moléculas GRK2 e CXCR2 - sabidamente participantes no mecanismo de migração do neutrófilo - em neutrófilos obtidos de sepse induzida em modelo experimental de CLP severa (sepse induzida por perfuração e ligação no ceco) (Martin EL e cols, 2010). Os autores observaram aumento da expressão de GRK2 e redução da expressão de CXCR2 (Martin EL e cols, 2010). Entretanto, em outro trabalho no qual foi realizada análise de amostras de pacientes com sepse, a baixa expressão do mRNA do gene GRK2 em pacientes com infecção bacteriana foi relacionado à redução da migração de polimorfonucleares, evidenciando que a literatura apresenta resultados controversos (Ubagai T e cols, 2014).

Os receptores do tipo *toll-like* (TLR) (do tipo II e tipo IV) foram demonstrados como indutores da expressão de CCR2 em neutrófilos de humanos sépticos e de modelo animal de CLP, conferindo a estas células a capacidade de migrar para órgãos alvo em resposta a ligantes CCL2 (Souto FO e cols, 2010). Dessa forma, esse aumento de migração local resulta em piora clínica associada a congestão vascular. No mesmo estudo, em neutrófilos obtidos de animais submetidos a CLP foi demonstrado que a supressão do NFκB associa-se à redução da migração de neutrófilos via regulação negativa de CCR2 (Souto FO e cols, 2010). Adicionalmente, utilizando modelo de CLP e amostras de pacientes com sepse, Wang e cols. demonstraram que a presença de molécula programadora de morte celular (PDL-1 - Programmed Death-ligand 1) estava expressa de forma aumentada em neutrófilos com fenótipo específico (baixos níveis de CD11a, CD62L e CCR2 e altos níveis de CD16 e CD64) que migravam de forma deficiente em ambos os casos analisados. A partir disso, os autores concluíram que a sepse induz expressão de PDL-1 o qual compromete a quimiotaxia dos neutrófilos (Wang JF e cols, 2015).

Em estudo realizado por Xu e cols (2015) foi detectada perda da capacidade de migração de neutrófilos, associada à detecção de C5a circulante em amostras obtidas de pacientes com sepse. Os autores sugeriram que, de maneira indireta, a liberação de C5a induziria a redução da liberação de IL8 pelo neutrófilo e, conseqüentemente, ocasionaria disfunção neutrofilica (Xu e cols, 2015).

Outra linha de investigação foi a análise indireta da capacidade migratória do neutrófilo através da investigação de moléculas envolvidas no rolamento e adesão dessas células. Neste perfil de análise, o estudo de Blom e cols demonstrou que neutrófilos expostos à plasma obtido de pacientes na fase aguda da sepse, ou seja, rico em citocinas predominantemente pró-inflamatórias, teriam alterações no mecanismo de adesão via β_2 -integrinas e ICAM-1 (Blom e cols, 2015).

Em um dos ensaios clínicos que foram incluídos nesta revisão foi analisado o efeito da lidocaína no recrutamento celular (Berger C e cols 2013). A lidocaína foi associada ao controle de adesão celular induzida por quimiocinas e transmigração de neutrófilos (Berger C e cols 2013). Desta forma, os autores sugeriram que a lidocaína possa ter efeito terapêutico nas fases de hiperinflamação, ao bloquear a aderência e recrutamento celular na sepse.

Nas análises moleculares para definição de mecanismos, destacaram-se o fator estimulador de granulócitos (G-CSF), que induziu retorno da migração do neutrófilo, assim como melhora da resposta imune em ratos submetidos à peritonite e tratados com esse fator (Gurleyik, G e cols, 2007). O G-CSF foi associado, desta forma, à melhora de resposta imune de neutrófilos em infecção grave (Gurleyik, G e cols, 2007).

Demaret e cols (2015) foram os únicos que, dentre os estudos selecionados, propuseram avaliação da função dos neutrófilos na fase tardia da sepse. Comparando células obtidas de pacientes sépticos com as de voluntários saudáveis, os autores identificaram que a redução da capacidade migratória dos neutrófilos permanece além da fase aguda da sepse. Apesar do influxo de células aumentada nesta fase, os neutrófilos apresentaram-se imaturos, com baixa expressão de CXCR1 e CXCR2 (Demaret J e cols, 2015).

Apoptose

A ocorrência de apoptose de neutrófilos na sepse foi investigada em cinco (26%) dos estudos incluídos na revisão. Em todos eles, os autores observaram redução da proporção de marcadores de apoptose celular em amostras de células de pacientes

sépticos e em modelos experimentais de sepse (Wang JF e cols, 2015; Demaret J e cols, 2015; Parlato M e cols, 2014; Gorgulu AP e cols, 2011; Celma IF e cols, 2008).

Os principais focos de investigação desses estudos foram a identificação de moléculas ou células indutoras de apoptose no neutrófilo, a presença de marcadores de apoptose e o teste de tratamento indutor da redução de apoptose. A molécula CD24 apresentou expressão reduzida em células de pacientes sépticos quando comparados com amostras de pessoas saudáveis. Segundo os autores, esse achado poderia explicar a apoptose reduzida dos neutrófilos, porque a presença do CD24 acarreta ruptura de membrana mitocondrial através da indução da via NADPH oxidase derivada de ROS (Parlato M e cols 2014). Observou-se níveis elevados da molécula Fas em pacientes sépticos, achado associado à redução de apoptose em neutrófilos circulantes de pacientes com sepse e de pacientes pós-trauma (Gorgulu AP e cols, 2011).

Wang e cols (2014) analisaram níveis de PDL-1 e detectaram aumento dessa molécula em camundongos submetidos a CLP com pico em 24h e observaram que o neutrófilo pode induzir apoptose de linfócito mediado por PDL-1 via contato direto dessas células. Assim, a sepse pode induzir regulação positiva de PDL-1 em neutrófilos sendo um subtipo inibitório o qual pode comprometer quimiotaxia e induzir apoptose linfocítica durante a sepse (Wang JF e cols, 2014). Redução no perfil de apoptose foi observada também em neutrófilos humanos provenientes de pacientes com sepse em período tardio, caracterizado como fase imunossupressora da síndrome (Demaret, J e cols 2015). Por fim, em outro estudo que avaliou apoptose, nos pacientes que receberam tratamento com vitamina C houve baixa marcação de caspase-3 em relação aos pacientes que receberam placebo (Celma, IF e cols, 2009). Assim, o tratamento com vitamina C foi destacado em causar piora no evento de atraso da apoptose.

Atividade fagocítica

A atividade de fagocitose foi abordada pela menor parte dos estudos incluídos nesta revisão, sendo que apenas três deles (15%) tiveram esse tópico como foco principal de investigação (Gurlevik, G e cols, 2007; Demaret, J e cols 2015; Danikas, DD e cols, 2008). Os achados foram concordantes em dois trabalhos no que se refere à diminuição da capacidade fagocítica de neutrófilos de pacientes sépticos (Gurlevik, G e cols, 2007; Danikas, DD e cols, 2008), e no terceiro estudo não foram observadas alterações nesta função do neutrófilo (Demaret, J e cols 2015).

Gurlevik, G e cols. identificaram o G-CSF como um potencial indutor da função imune devido ao seu papel em estimular a fagocitose realizada por neutrófilos obtidos de modelo CLP tratados com o G-CSF (Gurlevik, G e cols, 2007). Segundo esses autores, a redução da fagocitose em neutrófilos de pacientes sépticos associa-se a pior prognóstico, sendo mais intensa nos pacientes que falecem (Danikas, DD e cols, 2008).

Na análise de fagocitose realizada em neutrófilos provenientes de pacientes com sepse, Danikas e cols demonstraram significativa redução da fagocitose em relação a neutrófilos provenientes de pessoas saudáveis. Além disso, foi avaliada a expressão da molécula CD64, que evidenciou que pacientes que sobreviveram à sepse tinham a expressão desta molécula regulada positivamente associado a baixa capacidade fagocítica (Danikas, DD e cols, 2008).

A manutenção da capacidade fagocítica entre amostras de pacientes e controles saudáveis foi detectada em um estudo clínico publicado por Demaret e cols (2015). Nesse estudo, os neutrófilos eram obtidos na fase tardia da sepse (ie, de “paralisia imune”), e comparados com células de pessoas saudáveis. Na análise da atividade fagocítica não foram observadas modificações do perfil de atividade celular entre doentes e saudáveis (Demaret, J e cols 2015).

Outras perspectivas de análises da atividade do neutrófilo na sepse

Os outros seis trabalhos incluídos nesta revisão analisaram a presença de algumas moléculas potencialmente associadas à disfunção de neutrófilos na sepse, tais como, pentraxin 3 (PTX3), espécies reativas de oxigênio (ROS), mieloperoxidase (Daigo, K e cols, 2012; Santos, SS e cols, 2012; Martins, PS e cols, 2008; Kothari, N e cols, 2011; Khaenam, P e cols, 2014). Alguns estudos avaliaram o perfil de transcrição dessas moléculas em amostras de sangue de pacientes com sepse e pessoas saudáveis, na tentativa de associar alterações dos seus níveis com prognóstico clínico (Daigo, K e cols, 2012; Santos, SS e cols, 2012; Martins, PS e cols, 2008; Kothari, N e cols, 2011; Khaenam, P e cols, 2014).

Em relação ao PTX3, Daigo e cols observaram aumento dos níveis circulantes desta molécula em pacientes com sepse, sendo identificado também a formação de complexos com as Neutrophil Extracellular Traps (NETs) (Daigo, K e cols, 2012). Nesse estudo, o PTX3 foi identificado como possível alvo diagnóstico uma vez que esta molécula foi associada à detecção de componente extracelular de neutrófilos em altas concentrações em pacientes com sepse.

Dois estudos avaliaram a geração de ROS a partir de amostras de pacientes sépticos (Santos SS e cols, 2012; Martins PS e cols, 2008). O primeiro estudo detectou que pacientes com sepse apresentam altos níveis de ROS em amostras de sangue periférico e a manutenção de valores altos desta molécula é associada a pior desfecho clínico (Santos SS e cols, 2012). Outro estudo analisou níveis de ROS a partir da estimulação de neutrófilos com lipopolissacarídeo (LPS), peptídeo quimiotático fMLP (n-formil-metionil-leucil-fenilalanina) e *Staphylococcus aureus* (Martins PS e cols, 2008). O principal achado nesse estudo foi de que a produção de ROS foi diminuída na sepse grave após estimulação, tendo sido observada associação entre participação de neutrófilos e monócitos no metabolismo oxidativo. Por fim, nesse mesmo estudo o escore SOFA de 7 foi correlacionado com o metabolismo oxidativo servindo de corte entre pacientes que evoluíram para óbito ou sobreviveram (Martins PS e cols, 2008). Kothari N e cols (2011) demonstraram que a mieloperoxidase, apresentou altos níveis em amostras de pacientes com sepse e síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e baixos níveis nos pacientes em choque séptico em relação a grupo controle saudável.

Por fim, o último trabalho analisado abordou resposta transcricional em amostras de plasma de pacientes com sepse na predição da gravidade da sepse (Khaenam P e cols, 2014). Os autores identificaram que o neutrófilo apresenta respostas variadas nos pacientes sépticos e alguns genes foram relacionados a resposta imune nestes pacientes. Além disso, os PMN demonstraram melhor resposta sensorial aos fatores imunoestimulatórios identificados no plasma de pacientes com sepse (Khaenam P e cols, 2014).

Discussão

Nesta revisão sistemática sobre a atividade do neutrófilo na sepse que incluiu 19 estudos, observou-se que os três mecanismos principais de função de neutrófilos encontram-se alterados em pacientes sépticos, ou em modelos de animais com sepse, quais sejam, migração, fagocitose e apoptose. Além disso, algumas moléculas circulantes que participam do processo inflamatório na sepse, e potencialmente impactam na função de neutrófilos nessa condição, apresentaram níveis alterados em amostras de sangue de pacientes com esta síndrome, com destaque para PTX3.

O neutrófilo apresenta como principal função a fagocitose de partículas microbianas e destruição de agentes infecciosos através da ação de enzimas presentes em seus grânulos intracelulares (Murphy K e cols, 2010). Na inflamação, os neutrófilos são

as primeiras células a atravessarem o epitélio vascular para atingir o sítio de infecção e, para tanto, ocorre interação neutrófilo e endotélio para que ocorra o processo de rolamento, adesão e transmigração (Murphy K e cols, 2010).

No contexto da sepse, o neutrófilo tem dificuldade em atingir o agente causador de infecção porque tem sua capacidade de migração diminuída, o que foi observado de forma consensual nos trabalhos analisados. Há também relativa insensibilidade a estímulos quimiotáticos. Além disso, sabe-se que a ação de controle microbiano exercida pelos neutrófilos também fica alterada. Por fim, não há clareza sobre o que ocorre com a atividade fagocítica dessas células. Por exemplo, segundo Danikas DD e cols, a atividade fagocítica de neutrófilos nos pacientes com sepse grave encontra-se reduzida, e quanto maior a gravidade da infecção, mais intenso é esse comprometimento (Danikas DD e cols, 2008). Contudo, a correlação entre menor atividade da fagocitose e gravidade da sepse não foi comprovada em todos os estudos que testaram este evento (Gurlevik G e cols, 2007; Demaret, J e cols, 2015).

O outro evento de destaque foi o retardo na ocorrência de apoptose nos neutrófilos de pacientes sépticos. Em condições fisiológicas, essas células apresentam tempo de vida curto na circulação (*ie*, 7 a 10 horas). A redução do processo apoptótico em pacientes com sepse pode representar uma adaptação do organismo na ocorrência de um insulto infeccioso. Contudo, a despeito disso, há significativo comprometimento funcional dessas células nos casos de sepse grave. A manutenção da célula por mais tempo não foi associada a seu melhor desempenho; pelo contrário, este evento parece ocorrer de forma desregulada na sepse, e as células mantêm-se hiporresponsivas aos estímulos quimiotáticos (Wang JF e cols, 2015; Demaret J e cols, 2015; Parlato M e cols, 2014; Gorgulu AP e cols, 2011; Celma IF e cols, 2008).

Destaca-se, por fim, o grande número de moléculas solúveis detectadas em amostras de sangue dos pacientes ou em modelo experimental de sepse, como: IL1- β ; IL-4; IL-6; TNF- α ; C5a; CXCL8; PTX3; óxido nítrico; mieloperoxidase; fas (Daigo, K e cols, 2012; Santos, SS e cols, 2012; Martins, PS e cols, 2008; Kothari, N e cols, 2011; Khaenam, P e cols, 2014). Apesar da diversidade de moléculas solúveis detectadas em amostras de pacientes ou em modelo animal de sepse não foi possível identificar uma única molécula que fosse relacionada a fisiopatologia da sepse e a atividade do neutrófilo em trabalho clínico.

Os 19 estudos incluídos nesta revisão trouxeram informações valiosas acerca do neutrófilo no contexto da sepse. Resta, como desafio, a realização de estudos que possam

avaliar os diferentes aspectos apresentados de forma articulada e dinâmica, o que permitirá um melhor entendimento da função dos neutrófilos em pacientes portadores dessa grave condição. Tal conhecimento poderia contribuir para identificação de pacientes com pior prognóstico e com elaboração de eventuais intervenções terapêuticas na sepse.

Conclusão

A mudança do perfil de migração, da capacidade fagocítica e a de apoptose impacta na resposta do neutrófilo na sepse. Essas alterações funcionais dos neutrófilos parecem associadas à gravidade da sepse. O melhor entendimento desses distúrbios e o seu eventual tratamento poderão contribuir para melhora do prognóstico em pacientes com sepse.

Limitações

Nesta revisão tivemos limitações de acesso a trabalhos científicos que não contemplavam os descritores utilizados e realizamos a busca de artigos em apenas duas bases de dados. Além disso, a estipulação de período tempo para a pesquisa também foi um fator limitante para o levantamento de todos os trabalhos relacionados ao tema porque limita o acesso a trabalhos importantes que eventualmente foram publicados fora do tempo estipulado desta pesquisa.

Figura 1: Descrição da análise por pares e seleção dos artigos.

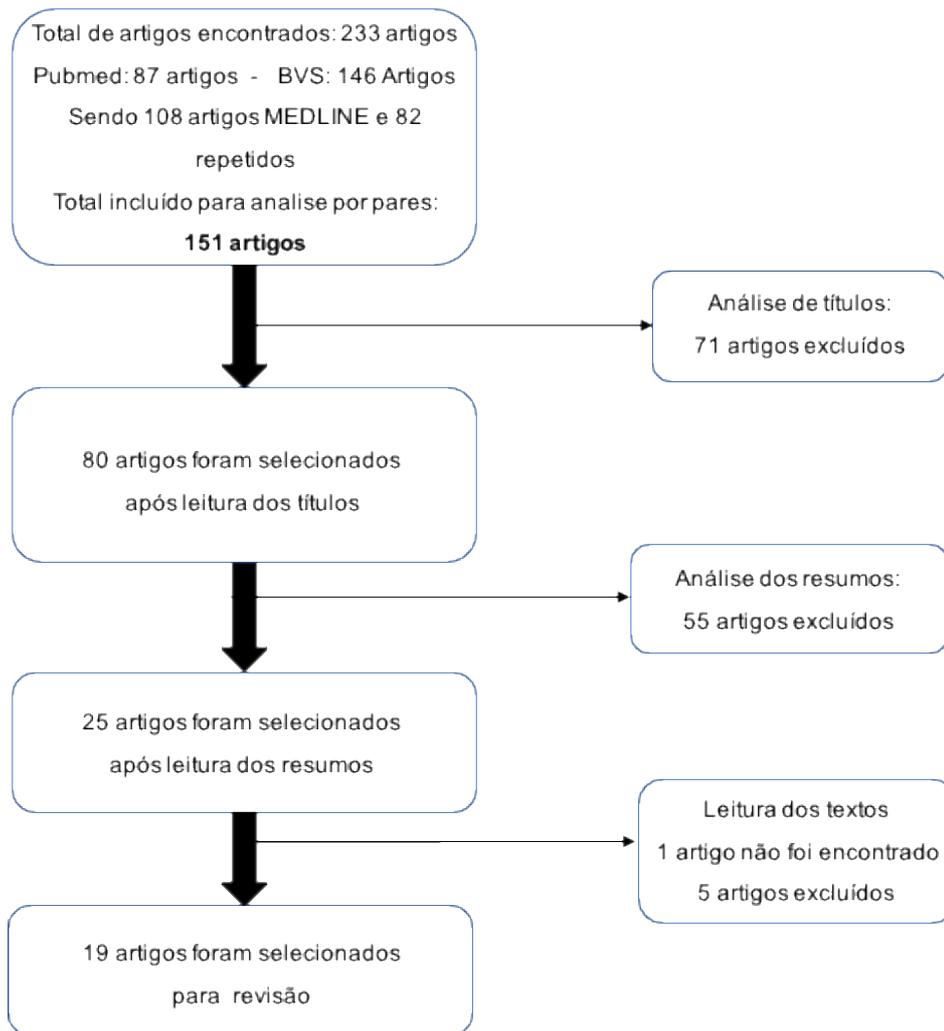


Tabela 1: Análise geral dos textos

Referência/ Ano de publicação	Tipo de estudo	Objetivo Principal	Principais Resultados
1. Gurleyik G e cols, 2007.	Experimental	Avaliar os efeitos do fator de estimulação das colônias de granulócitos (G-CSF) nas funções imunes de polimorfonucleares durante a infecção abdominal grave e sobre a sobrevivência em ratos com peritonite.	<ul style="list-style-type: none"> - A atividade quimiotática de neutrófilos tratados com G-CSF aumentou. - A sobrevivência aumentou nos ratos tratados. - Neutrófilos tem dificuldades na atividade em infecção peritoneal. - O tratamento com G-CSF melhorou a função imune de neutrófilos e monócitos.
2. Martin EL e cols, 2010.	Experimental	Analisar o papel específico da atividade de PI3K γ quinase na patogênese da sepse.	<ul style="list-style-type: none"> - A ausência da atividade da PI3kinase confere proteção contra mortalidade e falha de múltiplos órgãos. - Na CLP severa: bloqueio de PI3kinase manteve pressão arterial, protege dano no órgão (fígado e intestino) e também aumentou apoptose tecidual. - Apresentaram redução da atividade quimiotaxia de neutrófilos. - CLP grave: falha na migração de neutrófilos para peritônio, aumento de GRK2 e redução de CXCR2. - PI3kinase bloqueia influxo de neutrófilos. - Camundongos tratados para bloqueio da PI3kinase: apresentaram reduzida mortalidade, melhora da migração de neutrófilos e do controle bacteriano. - Aumento de PD-L1 em camundongos submetidos a CLP com pico em 24h.

3. Wang JF e cols, 2015.	Experimental e clínico (caso controle – prospectivo)	<p>Avaliar o nível de expressão de PDL-1 em neutrófilos de camundongos e pacientes sépticos.</p> <p>Avaliar se neutrófilos de camundongos poderiam induzir apoptose de linfócitos por PDL-1 através de sistema transwell e anticorpo anti-PDL1.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Neutrófilo PD-L1+:CD11a, CD62L e CCR2 baixos e CD16, CD64 altos apresentaram comprometimento da capacidade migratória. - Neutrófilo pode induzir apoptose de linfócito via contato direto mediado por PDL1. - Baixa de CD11a e CCR2 associado a redução de quimiotaxia do neutrófilo. - PDL1+ apresentou comprometimento de migração. - Sepses pode induzir regulação positiva de PDL1 em neutrófilos sendo um subtipo inibitório o qual pode comprometer quimiotaxia e induzir apoptose linfocítica durante a sepsis.
4. Schmidt EP e cols, 2012.	Experimental e clínico	<p>Avaliar a lesão pulmonar aguda (ALI) associada à sepsis correlacionando com degradação do glicocálice endotelial pulmonar, inflamação e adesão de neutrófilos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Exposição de camada do endotélio após exposição a partículas bacterianas como endotoxina, levam ao reconhecimento e adesão de neutrófilos na membrana vascular via ICAM-1 e VCAM-1. - Heparanase como potencial efeito protetor pulmonar durante a sepsis. - A exposição de moléculas no endotélio é importante para adesão de neutrófilos e mecanismos como baixa de glicocálix pode induzir extravasamento de neutrófilos.
5. Souto FO e cols, 2010.	Experimental e Clínico	<p>Avaliar o papel do receptor de quimiocina CCR2 na condução da infiltração de neutrófilos e danos nos tecidos nos órgãos remotos durante a sepsis.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - TLR2 e TLR4 participam da quimiotaxia de neutrófilos. - Os neutrófilos tratados com antagonista de CCR2 ou camundongo nocaute para CCR2 aboliram quimiotaxia via TLR. - A expressão de CCR2 foi aumentada em neutrófilos tratados com LTA e LPS. - Necessidade de CHX (síntese de proteínas) para expressar CCR2 via estímulo com LTA e LPS. - Quimiotaxia do neutrófilo foi totalmente abolida após inibição de NFκB. - Os receptores de TLR direcionam a expressão de CCR2 via NFκB.

<p>6. Xu R e cols, 2015.</p> <p>Clínico</p>	<p>Avaliar os níveis de C5aR e níveis de C5L2 em neutrófilos de pacientes com SIRS e sepse.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - A regulação aumentada de CCR2 na sepse é mediada via sinalização TLR. - Sinalização TLR induz expressão de CCR2 em neutrófilos, conferindo a estas células a capacidade de migrar em resposta a ligantes CCR2. - Pacientes sépticos apresentaram alta contagem de neutrófilos comparado a paciente com SIRS. - O percentual de expressão de C5L2 foi reduzida em neutrófilos de pacientes sépticos. - A expressão de C5aR e C5L2 pode servir de biomarcador para predizer sobrevivência de pacientes sépticos. - A exposição dos neutrófilo ao C5a acarreta a menor expressão de C5aR. - Neutrófilos de pacientes sépticos apresentaram baixa habilidade em secretar IL8 em resposta a C5a in vitro quando comparado a controle saudáveis e SIRS. - Altos níveis de C5a e C5L2 em neutrófilos foi associado a sobrevivência de pacientes sépticos enquanto que baixos níveis de C5aR e C5L2 em neutrófilos foi associado bom preditor de mortalidade em pacientes sépticos. - C5a induz prejuízo na produção de IL8 pelos neutrófilos. Este fenômeno pode ser associado a “paralisia imune” que ocorre na sepse.
<p>7. Demaret J e cols, 2015.</p> <p>Clínico</p>	<p>Avaliar as alterações imunossupressoras dos neutrófilos nos pacientes sépticos utilizando estudos fenotípicos e funcionais.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - As análises foram realizadas na fase tardia da sepse para que fosse analisado os neutrófilos em período de imunossupressão da sepse. - Número de neutrófilos circulantes foi maior em pacientes sépticos quando comparado a valores normais. - CXCR1 e CXCR2 também apresentaram expressão reduzida em pacientes sépticos.

		<ul style="list-style-type: none"> - Neutrófilos estimulados por IL8, fMLP e GRO apresentaram menor capacidade migratória em pacientes sépticos quando comparado a voluntários saudáveis. - Para a capacidade de fagocitose não houve diferença entre pacientes e controle. - Na análise do estresse oxidativo: em células de pacientes o estresse oxidativo foi menor do que em voluntários saudáveis. - A produção de agentes bactericidas foi prejudicada após o choque séptico. - A apoptose é diminuída. - Redução da capacidade migratória dos neutrófilos.
<p>8. Blom C e cols, 2015. Clínico</p>	<p>Avaliar marcadores inflamatórios no plasma de pacientes com sepse grave para criar uma mix experimental de citocinas e usá-lo para investigar a ativação e interações de leucócitos polimorfonucleares e células endoteliais cerebrosvasculares humanas in vitro.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - A estimulação de PMN com mistura de citocinas não acarretou aumento de adesão das células virgens. - O estímulo dos PMN com mistura de citocinas resultou na redução da capacidade de adesão das células. - Nas primeiras 24h de sepse, o paciente demonstra PMN com perfil de maior regulação para adesão.
<p>9. Khaenam P e cols, 2014. Clínico</p>	<p>Avaliar o perfil transcriptômico de neutrófilos, monócitos e células dendríticas na tentativa de se obter o perfil de respostas imunes em escala de sistemas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - A célula do neutrófilo é importante na identificação de transcriptomas que possam prever gravidade da sepse. - O neutrófilo apresentou resposta diferente em amostras de pacientes sépticos com a identificação de 709 genes relacionado com resposta imune. - As 30 transcrições demonstraram alta acurácia para prever sepse. - Maior número de células em apoptose após aplicação do anticorpo anti-CD24. - Aumento de CD16 na membrana de neutrófilos marcados com anti-CD24.

<p>10. Parlato M e cols, 2014.</p>	<p>Clínico</p>	<p>Avaliar a via apoptótica em neutrófilos humanos que é desencadeada através da molécula de superfície CD24.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - O sinal de apoptose nos neutrófilos através de CD24 foi traduzido via caspase 3/ caspase 9. - Inibiram apoptose via bloqueio do sistema NADPH com DPI e apocinina. - Demonstrando que o uso de DPI bloqueia apoptose induzida também pela via CD24. - A CD24 induz apoptose nos neutrófilos via colapso de membrana mitocondrial. - O stress oxidativo contribui para morte de neutrófilo via CD24. - Neutrófilos de pacientes sépticos tem expressão reduzida de CD24. - A ligação de anticorpo com CD24 induz apoptose em neutrófilos. - CD24 é gatilho para morte celular via despolarização de membrana mitocondrial, geração de ROS e ativação de procaspase-9 em neutrófilos humanos. - A apoptose de neutrófilos de pacientes críticos levaram de 8 a 10 horas para apoptose, enquanto a meia vida de neutrófilos de pessoas saudáveis leva de 7-10 horas.
<p>11. Tsuneyuki U e cols. 2013.</p>	<p>Clínico</p>	<p>Avaliar a expressão de genes do receptor desencadeante em células mielóides (TREM) -1 e receptor de proteínas G-acoplado-cinase (GRK) -2 em PMN isoladas de pacientes.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Expressão dos níveis do gene TREM1 em 4 (de 7 pacientes) pacientes com pneumonia moderada foi alto. - Seis pacientes apresentaram baixa expressão de TREM1 comparado com pacientes saudáveis. - Os níveis de TREM1 foram baixos em pacientes com sepse. - A incubação de PMN com oligopeptídeo de TREM1 aumentou os níveis de TREM1 RNA.

<p>12. Daigo K e cols, 2012.</p> <p>Clínico</p>	<p>Avaliar ligantes de PTX3 na sepse, através de um estudo proteômico direcionado de complexos de PTX3 circulantes.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Nível de mRNA de GRK2 tiveram expressão reduzidos em pacientes com infecção bacteriana, indicando supressão de migração de PMN. - Alta concentração de PTX3 em amostras de sangue. - Identificaram 104 proteínas candidatas a interação com PTX3 envolvendo ativação do complemento, opsonização de patógeno, regulação de inflamação e deposição de matrix extracelular. - O perfil proteomico demonstrou que o PTX3 formou complexos com alguns componentes NETs. - PTX3 como possível alvo terapêutico e função de defesa.
<p>13. Santos SS e cols, 2012;</p> <p>Clínico</p>	<p>Avaliar a geração de oxigênio reativo (ROS) e óxido nítrico (NO) por monócitos e neutrófilos de pacientes sépticos e correlacionar seus níveis com os desfechos clínicos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - A produção de NO pelos monócitos foi alta em pacientes sépticos comparado com voluntários saudáveis.
<p>14. Kothari, N e cols, 2011.</p> <p>Clinico</p>	<p>Avaliar a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no plasma de pacientes críticos e verificar a hipótese de que essas concentrações no plasma seriam maiores na sepse e condições inflamatórias sistêmicas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento de Mieloperoxidase em pacientes com SIRS e sepse, no entanto, pacientes com choque sépticos apresentaram baixa contagem de células e de MPO. - Os Níveis de citocinas também foi elevado em pacientes com SIRS, sepse e choque séptico.
		<ul style="list-style-type: none"> - Apoptose foi reduzida durante o período observado comparado com células controle.

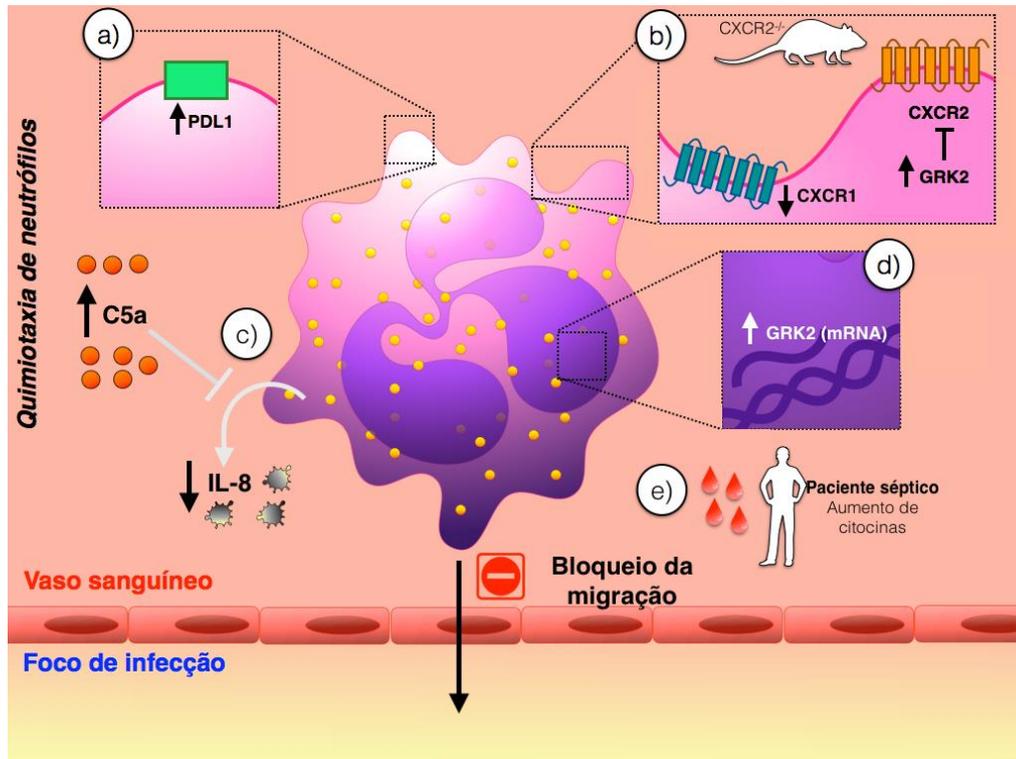
<p>15. Adnana PG e cols, Clínico 2011.</p>	<p>Avaliar o papel de Fas solúvel (sFas) na regulação da apoptose extrínseca de neutrófilos pós-traumáticos e no desenvolvimento de sepse.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Elevados níveis de Fas solúvel pode inibir apoptose em neutrófilos circulantes e promover atividade celular prolongada. - A apoptose foi reduzida em pacientes que desenvolveram sepse subsequente ao trauma.
<p>16. Danikas DD e cols, Clínico 2008.</p>	<p>Avaliar o impacto da atividade fagocítica de neutrófilos e monócitos no desfecho de pacientes com sepse grave.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - A atividade fagocítica de PMN no dia de admissão foi reduzida em pacientes com sepse severa que não sobreviveram comparado com indivíduos saudáveis. - A expressão de CD64 em PMNs e monócitos de pacientes com sepse severa que sobreviveram foi significativamente aumentada comparada com controle saudável. - Em pacientes que sobreviveram, houve uma regulação negativa da expressão de CD64 em PMNs e monócitos quando comparado a dosagem do dia de admissão e resolução. - Demonstraram correlação positiva entre atividade de PMNs e expressão de CD64 na admissão. - Em análise univariada foi demonstrado significante correlação positiva entre resultados clínicos com atividade fagocítica de PMNs assim como entre resultado clínico e expressão de CD64 em monócitos e PMNs. - O aumento da atividade fagocítica e expressão de CD64 nos fagócitos teve impacto favorável na sobrevivência. - A atividade fagocítica de PMNs parece ser preditor independente para sobrevivência em pacientes com sepse severa.

17. Martins PS e cols, 2008.	Clínico	Avaliar a ativação celular no contexto da sepse e sua correlação com a disfunção orgânica.	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa expressão de TLR2 em grupo de pacientes com choque séptico comparado com grupo controle. - O score SOFA de 7 foi o nível para discriminar entre os pacientes que sobreviveram e não sobreviveram.
18. Christian B e cols, 2013.	Ensaio Clínico duplo cego	Avaliar o efeito da lidocaína no recrutamento de leucócitos em pacientes sépticos.	<ul style="list-style-type: none"> - A lidocaína inibiu fortemente o aumento de quimiocina induzida nos neutrófilos em 4 e 24h após início da medicação. - Neutrófilos apresentaram aumento no tempo de aderência para rolamento de células em meio com P-selectina/ ICAM-1/ IL8 comparado com meio de P-selectina/ ICAM-1. - Em neutrófilos isolados, a lidocaína demonstrou ter efeito em bloquear o rolamento - O pré-tratamento com lidocaína e Ro 31 8220 reduziu significativamente a adesão. - Neutrófilos incubados com plasma obtido de pacientes antes da administração do medicamento demonstrou alta transmigração comparado com neutrófilos incubados de voluntários saudáveis. - A transmigração de neutrófilos incubados com plasma de pacientes sépticos tratados com lidocaína apresentou significante redução em relação a neutrófilos que foram incubados com plasma de pacientes sépticos tratados com salina.
19. Ignacio FC e cols,		Avaliar o efeito da administração parenteral de vitamina C na apoptose de neutrófilos através da determinação	<ul style="list-style-type: none"> - O receptor Fas em neutrófilos CD15+ foi reduzido em pacientes tratados com vitamina C em relação a voluntários saudáveis, mas não foi diferente em pacientes tratados com placebo. - A contagem de neutrófilos foi alta em ambos os grupos tratados comparado com saudáveis.

2009.	Ensaio Clínico duplo cego	da expressão do receptor de Fas e dos níveis de caspase-3, poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) e Bcl-2 em neutrófilos de pacientes com cirurgia abdominal séptica.	<ul style="list-style-type: none"> - Caspase-3, PARP e Bcl-2 foram significativamente reduzidos em voluntários saudáveis do que nos grupos placebo e tratado com vitamina c. - Caspase 3 e PARP foi baixo no grupo tratado com vitamina c em relação ao placebo. - Bcl-2 apresentou-se alto em grupo tratado com vitamina C em relação ao placebo.
-------	---------------------------	--	---

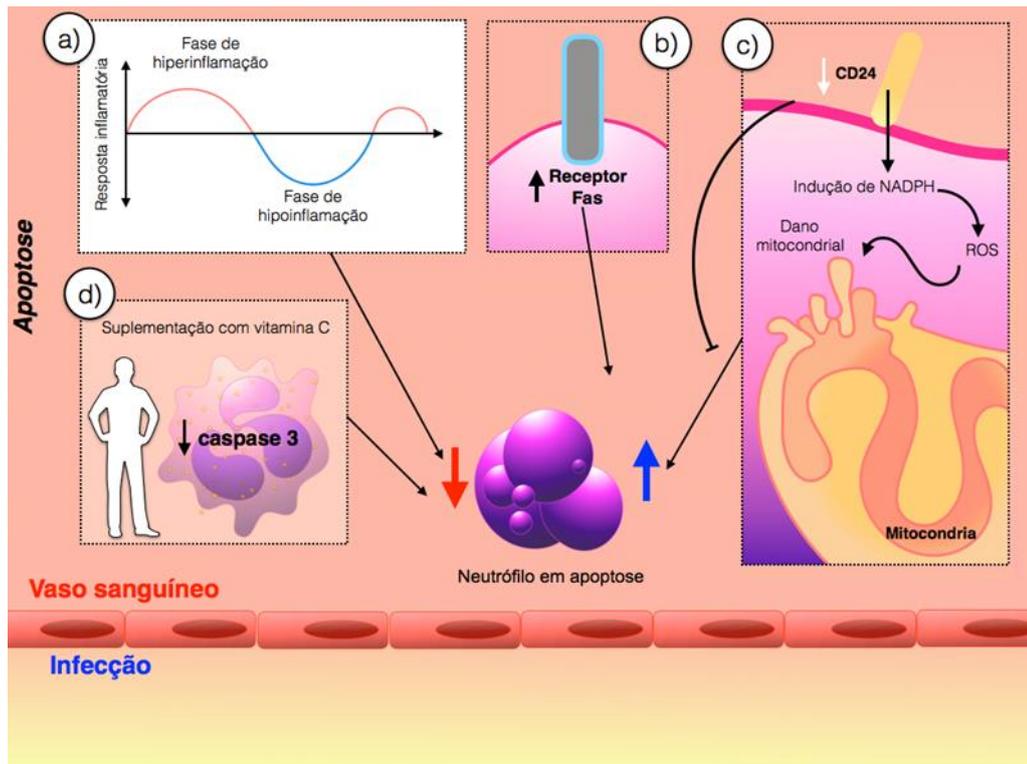
Figura 2: Perfil de quimiotaxia, apoptose e fagocitose do neutrófilo na sepse:

i)



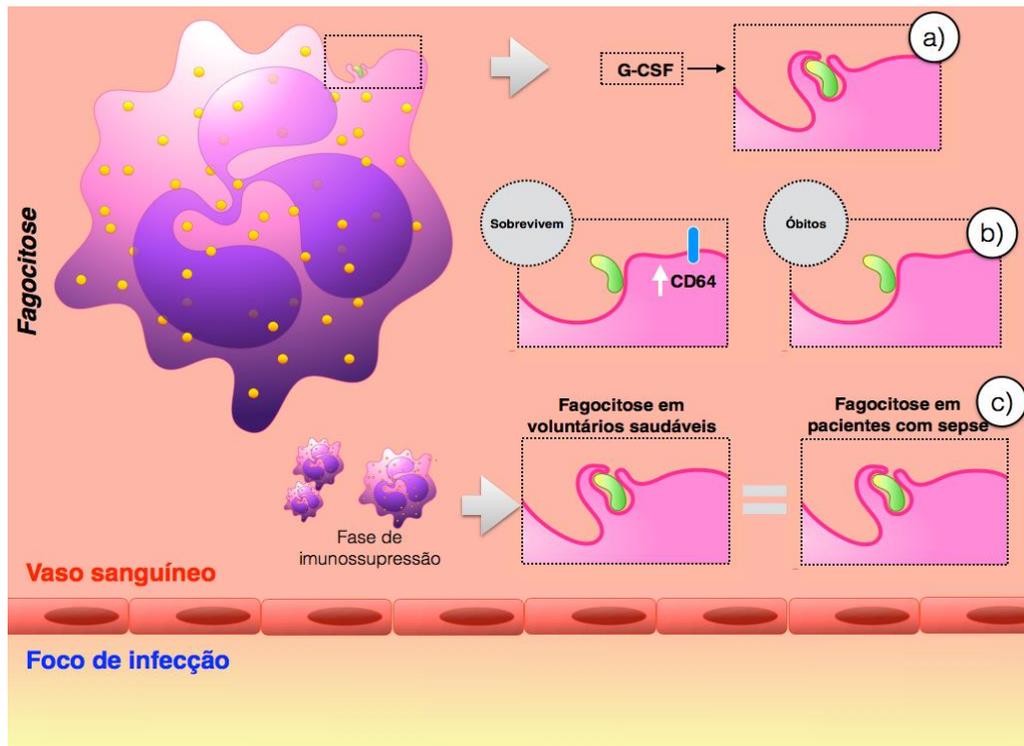
Descrição dos principais mecanismos relacionados a quimiotaxia de neutrófilos na sepse. a) O aumento de PDL-1 foi associado a redução da quimiotaxia; b) Ocorre a internalização do receptor de CXCR2 quando GRK2 tem aumento de expressão resultado em queda da quimiotaxia. A internalização de CXCR1 foi associada a queda de quimiotaxia de neutrófilos; c) O aumento de C5a no sangue foi associado ao bloqueio do estímulo quimiotático exercido pela IL8 no neutrófilo; d) Aumento da expressão de GRK2 em neutrófilos com queda de quimiotaxia; e) Pacientes sépticos tem aumento de citocinas no sangue. Referências: Gurleyik G e cols, 2007; Martin EL e cols, 2010; Wang JF e cols, 2015; Schmidt EP e cols, 2012; Souto FO e cols, 2010; Xu R e cols 2015; Demaret J e cols 2015; Blom C e cols, 2015; Ubagai T e cols, 2014; Berger C e cols, 2013. Fonte: Figura criada para este artigo.

ii)



ii) Descrição dos principais mecanismos relacionados a fagocitose de neutrófilos na sepse. a) Na fase de hiporresponsividade da sepse há redução da apoptose do neutrófilo. b) O aumento da expressão do receptor Fas foi associado ao aumento de apoptose de neutrófilos; c) A redução da expressão do receptor CD24 foi associada ao aumento de apoptose de neutrófilos através da indução do NADPH e consequente dano mitocondrial; d) Pacientes que receberam vitamina C apresentaram menor expressão de caspase 3. Referências: Wang, JF e cols, 2015; Demaret, J e cols, 2015; Parlato, M e cols, 2014; Gorgulu, AP e cols, 2011; Celma, IF e cols, 2008). Fonte: Figura criada para este artigo. Figura criada para este artigo.

iii)



iii) Descrição dos principais mecanismos relacionados a fagocitose de neutrófilos na sepse. a) O fator de crescimento G-CSF foi associado ao aumento de fagocitose pelo neutrófilo; b) Pacientes que sobreviveram ao evento séptico apresentaram maior expressão de CD64 em relação a pacientes que evoluíram a óbito; c) Na fase de imunossupressão da sepse, o evento de fagocitose ocorreu na mesma proporção que voluntários saudáveis. Referências: Gurlevik, G e cols, 2007; Demaret, J e cols 2015; Danikas, DD e cols, 2008. Fonte: Figura criada para este artigo.

Referencial Bibliográfico (Artigo 1):

Alves JC, Spiller F, Cunha FQ. **Neutrophil paralysis in sepsis.** Shock, 2010. 34:15-21.

Alves JC, Freitas A, Souto FO, Spiller F, Paula-Neto H, Silva JS, e cols. **Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis.** Proc Natl Acad Sci USA, 2009. 106:4018–23.

Alves JC, Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ. **The role of neutrophils in severe sepsis.** SHOCK, 2008. 3-9.

Balk RA. **Severe sepsis and septic shock.** Crit Care Clin 2000; 16:179–92.

Berger C; Rossaint J; Aken HV; Westphal M; Hahnenkamp K; Zarbock A. **Lidocaine Reduces Neutrophil Recruitment by Abolishing Chemokine-Induced Arrest and Transendothelial Migration in Septic Patients.** J Immunol. 2014, 192:367-376.

Blom C; Deller BL; Fraser DD; Patterson EK; Martin CM; Young B. **Human severe sepsis cytokine mixture increases β 2-integrin-dependent polymorphonuclear leukocyte adhesion to cerebral microvascular endothelial cells in vitro.** Critical Care. 2015, 19:149.

Celma IF; Mansilla A; Hassan L; Navarro AG; Comino AM; Bueno P. **Effect of Vitamin C Administration on Neutrophil Apoptosis in Septic Patients After Abdominal Surgery.** Journal of Surgical Research. 2009; 153, 224–230.

Daigo K; Yamaguchi N; Kawamura T; Matsubara K; Jian S; Ohashi R e cols. **The proteomic profile of circulating pentraxin 3 (PTX3) complexes in sepsis demonstrates the interaction with azurocidin 1 and other components of neutrophil extracellular traps.** Molecular e Cellular Proteomics. 2012.

Demaret J; Venet F; Friggeri A; Cazalis MA; Plassais J; Jallades L. **Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression.** *J. Leukoc. Biol.* 2015, 98: 1081–1090.

Danikas DD; Karakantza M; Theodorou GL; Sakellaropoulos GC; Gogos CA. **Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression.** Clinical and experimental immunology. 2008; 154:87-97.

Furze RC, Rankin SM. **Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow.** Immunology, 2008; 125, 281–288.

Gorgulu AP; Flohé S; Scholz M; Windolf J; Logters T. **Increased serum soluble Fas after major trauma is associated with delayed neutrophil apoptosis and development of sepsis.** *Critical Care*. 2011; 15:R20.

Gurlevik G; Yanikkaya G; Gurleyik E; Ozturk E; Dulundu E; Saglam A. **Effects of granulocyte-colony stimulating factor on the polymorphonuclear leukocyte activity and course of sepsis in rats with experimental peritonitis.** 2007, 37:401-405.

Kothari N; Keshari RS; Bogra J; Kohli M; Abbas H; Malik A e cols. **Increased myeloperoxidase enzyme activity in plasma is an indicator of inflammation and onset of sepsis.** *Journal of Critical Care*. 2011; 26, 435.e1–435.e7.

Khaenam P; Rinchai D; Altman MC; Chiche L; Buddhisa S; Kewcharoenwong C e cols. **A transcriptomic reporter assay employing neutrophils to measure immunogenic activity of septic patients' plasma.** *Journal of translational Medicine*. 2014; 12:65.

Lerman YV and Kim M. **Neutrophil Migration under normal and sepsis condition.** *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2015; 15(1): 19–28.

Levy MM; Fink MP; Marshall JC e cols. **SSCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference.** *Crit Care Med* 2003; 31: 1250–56.

Martins PS; Brunialti MKC; Martos LSW; Machado FR; Assunção MS; Blecher S. **Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis.** *Critical Care* 2008, 12:R25.

Martin EL; Souza DG; Fagundes CT; Amaral FA; Assenzio B; Puntorieri V e cols. **Phosphoinoside-3 kinase γ activity contributes to sepsis and organ damage by altering neutrophil recruitment.** *Am J Respir Crit Care Med*. 2010, 182: 762-773.

Parlato M; Guimaraes FSF; Philippart F; Misset B; e cols. **CD24-Triggered Caspase-Dependent Apoptosis via Mitochondrial Membrane Depolarization and Reactive Oxygen Species Production of Human Neutrophils Is Impaired in Sepsis.** *Journal of Immunology*. 2014, 192:2449-2459.

Santos SS; Brunialti MKC; Rigato O; Machado FR; Silva E; Salomao R. **Generation of nitric oxide and reactive oxygen species by neutrophils and monocytes from septic patients and association with outcomes.** *SHOCK*. 2012, Vol. 38, No. 1, pp. 18Y23.

Schmidt EP; Yang Y; Janssen WJ; Gandjeva A; Perez MJ; Barthel L e cols. **The**

pulmonary endothelial glycocalyx regulates neutrophil adhesion and lung injury during experimental sepsis. *Nat Med.* 2012; 18(8).

Souto AO; Filho JCA; Turato WM; Martins MA; Filho AB; Cunha FQ. **Essential Role of CCR2 in Neutrophil Tissue Infiltration and Multiple Organ Dysfunction in Sepsis.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; Vol 183. pp 234–242.

Ubagai T; Nakano R; Kikuchi H and Ono Y. **Gene Expression Analysis of *TREMI* and *GRK2* in Polymorphonuclear Leukocytes as the Surrogate Biomarkers of Acute Bacterial Infections.** *International Journal of Medical Sciences.* 2014, 11(2):215-221.

Wang JF; Li JB; Zhao YJ; Yi WJ; Bian JJ; Wan XJ. **Up-regulation of Programmed Cell Death 1 Ligand 1 on Neutrophils May Be Involved in Sepsis-induced Immunosuppression.** *Anesthesiology.* 2015, 122:852-63.

Xu R; Lin F; Bao C; Huang H; Ji C; Wang S e cols. **Complement 5a receptor-mediated neutrophil dysfunction is associated with a poor outcome in sepsis.** *Cellular & Molecular Immunology.* 2016;13, 103–109.

II. JUSTIFICATIVA

A sepse é uma síndrome responsável por grande número de óbitos em unidades de terapia intensiva e a sua incidência vem aumentando nos últimos anos. Ainda que se tenha observado melhora do prognóstico da sepse nas últimas décadas, a mortalidade em países em desenvolvimento – incluindo o Brasil – permanece muito elevada. O estudo de moléculas inflamatórias e da atividade do neutrófilo na sepse tem sido foco de diversos trabalhos, mas ainda permanece em aberto a análise dos eventos moleculares e celulares sob uma perspectiva multifatorial e em grupos específicos de pacientes com sepse. Assim, neste trabalho buscamos investigar eventos relacionados a atividade do neutrófilo associada a níveis de moléculas inflamatórias em pacientes com sepse e estabelecer o perfil de ocorrência desses eventos sob uma perspectiva multifatorial, ou seja, em que os eventos da resposta imune inata ocorrem simultaneamente em modelo clínico.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo Geral

- Avaliar o perfil de resposta inflamatória e atividade dos neutrófilos, e sua associação com a sobrevivência e gravidade da sepse em pacientes internados na UTI de adultos do HC/UFGM.

III.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil demográfico e clínico dos pacientes com sepse e choque séptico internados na UTI de adultos do HC/ UFGM, além dos principais desfechos apresentados por esses pacientes, no curto e no longo prazo;
- Avaliar os níveis de quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10) e da molécula pentraxin-3 na fase inicial da sepse, ou seja, após inclusão no estudo;
- Avaliar os níveis séricos das citocinas IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-17 no primeiro dia após inclusão no estudo;
- Avaliar a associação dos níveis séricos de citocinas, quimiocinas e pentraxin-3 com dados de sobrevivência e gravidade da sepse;
- Avaliar os níveis de NETs nos dias 1, 3 e 7 após inclusão e investigar a associação entre esses níveis e dados de sobrevivência e gravidade da sepse.
- Avaliar a capacidade de migração de neutrófilos em um subgrupo de pacientes com sepse;
- Avaliar apoptose de neutrófilos em um subgrupo de pacientes com sepse;

IV. METODOLOGIA

IV. 1 Delineamento do estudo

Coorte prospectiva, iniciada em outubro de 2014 até janeiro de 2018. Foram incluídos 81 pacientes após consentimento e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

IV. 2 Sujeitos da Pesquisa

- Todos os pacientes admitidos a partir do mês de outubro de 2014 na UTI do HC-UFGM com diagnóstico confirmado de sepse foram considerados para elegibilidade no estudo. Ainda que este estudo tenha sido concebido antes da publicação do consenso Sepsis 3 (Seymour CW e cols 2016; Shankar-Hari M e cols, 2016; Abraham E, 2016) o diagnóstico de sepse foi confirmado segundo essa nova definição em todos os todos os pacientes incluídos.

Tamanho amostral:

Utilizou-se amostra de conveniência.

Critério de inclusão:

Pacientes com diagnóstico clínico de sepse ou choque séptico (conforme a definição Sepsis 3); com idade maior ou igual a 18 anos; internados na UTI adulto do HC/UFGM; e que assinaram o TCLE.

Critérios de exclusão:

- Pacientes com contagem de neutrófilos menor que 500 cels/mm^3 ou menor que 1.000 cels/mm^3 associado a previsão de queda para 500 cels/mm^3 nas 48h seguintes.
- Pacientes em uso de corticoides com dose acima ou igual a 2mg/Kg/dia de prednisona ou fármaco equivalente.
- Pacientes com diagnóstico de sepse, porém sob uso de antibióticos por período acima de 48h.
- Pacientes portadores de vírus de imunodeficiência humana, com $\text{CD4}^+ < 200 \text{ cels/mm}^3$.
- Pacientes submetidos a transplante de órgão sólido ou de tecido no intervalo de tempo de um ano.

- Pacientes com previsão de óbito para as próximas 24 horas a partir da avaliação de elegibilidade.

Grupo controle:

Adultos (idade ≥ 18 anos) sabidamente saudáveis, sem história de adoecimento agudo na última semana (gripe, traumatismo, início de uso de medicamentos).

Local de Realização:

UTI de adultos do HC/ UFMG.

Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória – ICB/ UFMG.

IV. 3 Coleta e análise dos dados

Dados Clínicos:

Foram coletadas informações referentes ao sexo, idade, sítio de infecção, uso de medicações vasopressoras (noradrenalina) e inotrópicas (dobutamina), uso de medicações relacionadas ao tratamento do foco infeccioso (antibióticos, antifúngicos), resultados de culturas e registro de hemotransfusões.

Os pacientes foram classificados quanto ao valor do escore APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*) (Knaus WA e cols; 1985), SAPS 3 (*Simplified Acute Physiology Score 3*) (Le Gall JR e cols, 1993) e SOFA (Vicent JL e cols; 1998) para análise de parâmetro clínico e gravidade da doença.

Coleta de material biológico:

- Pacientes: Foram coletados 10 ml de sangue em até 48h de uso de antibiótico após inclusão no estudo e diagnóstico clínico da sepse de pacientes internados na UTI de adultos HC/UFMG, sendo: 6 mL em tubo à vácuo com heparina e 4 mL em tubo vácuo para sorologia. O sangue foi obtido através de cateter central ou por punção venosa. Todo material utilizado no procedimento foi estéril e descartável.

Para as análises de NETs e quimiocinas, foi coletado amostras também no terceiro (D3) e sétimo dia (D7) após inclusão no estudo.

- Voluntários Saudáveis:

Foram coletados 10mL de sangue sendo 5 mL armazenados em tubo à vácuo com heparina e 5 mL em tubo vácuo para sorologia. O sangue foi obtido através de punção venosa periférica.

Testes com amostras de sangue

As amostras de sangue de todos os pacientes e controles foram processadas e submetidas aos seguintes testes:

Marcadores inflamatórios:

A quantificação de citocinas e quimiocinas foi realizada no soro das amostras de pacientes sépticos e voluntários saudáveis. O soro foi obtido a partir de centrifugação e estocado a -80° C para posterior análise. Os níveis séricos de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-17, CCL3, CXCL10, CCL2, CCL8, CXCL9, CCL5, pentraxin-3 (PTX3) e NETs foram mensurados através do teste de Enzyme-linked immunosorbent assays (E.L.I.S.A., R&D System para dosagem em espectrofotômetro) usando anticorpos da R&D System.

Placas de 96 poços foram cobertas com 50 μ L/poço do anticorpo específico e os resultados estão expressos em picogramas/ mL.

Purificação de neutrófilos

Após coleta do sangue total dos pacientes e controles, o mesmo foi colocado em meio de cultura RPMI e, então, submetido a processo de separação de células através da técnica de gradiente de densidade. Foi utilizado histopaque 11191 e histopaque 1077 para separação das células (figura 3). Em seguida, iniciou-se o processo com a pipetagem de 3mL de histopaque 11191 seguido do acréscimo de 3mL de histopaque 1077 para formação de duas camadas de solução. A solução de sangue total e meio RPMI foi repassada de maneira delicada para o frasco que contém os histopaques para que ocorresse a formação da terceira camada de solução no frasco. Após centrifugar o sangue com os histopaques, retirou-se as células através de pipetagem, o que foi seguido de nova centrifugação. Em seguida, fez-se a lise das hemácias e nova centrifugação para obtenção dos neutrófilos. Por fim, fez-se a contagem de células em microscopia na Câmara de Neubauer.

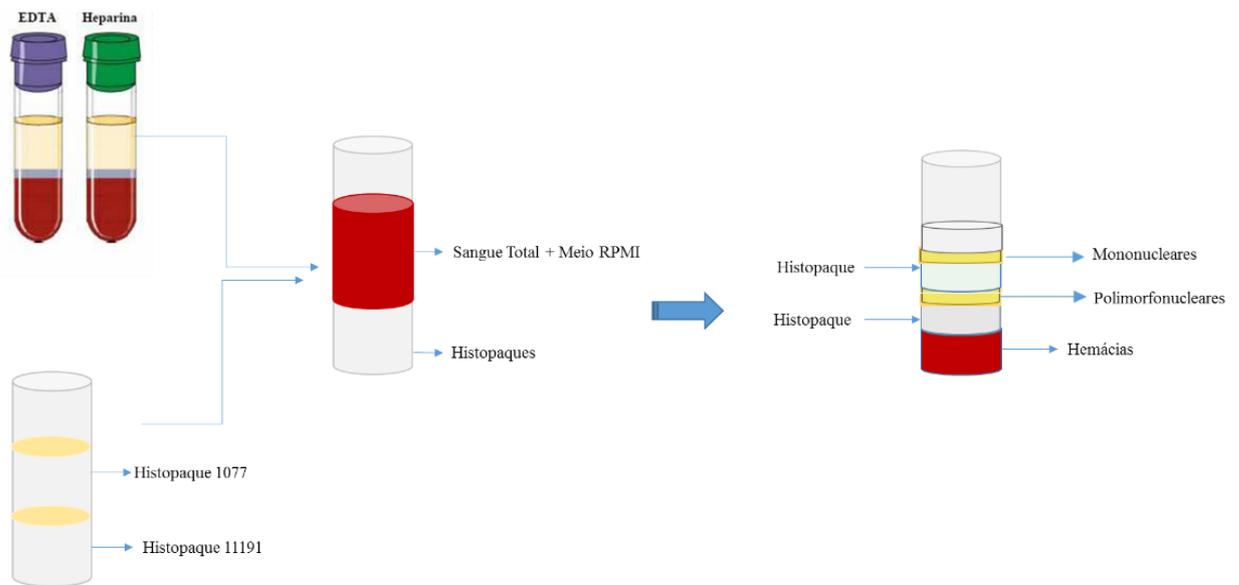


Figura 3- Técnica de Separação de Neutrófilos: O sangue total é separado através de diferença de densidade das soluções de histopaques (1077 e 11191).

- Ensaio de migração celular (*in vitro*):

Depois de separado os neutrófilos, estes foram diluídos em 1 mL de RPMI/BSA 0,01% (soro albumina bovina; Sigma chemical Co, St. Louis, MO – USA). Os neutrófilos foram contados em câmara de Neubauer com líquido de Turk (ácido acético glacial a 2%, violeta de genciana a 1% em água destilada). O número destas células foi ajustado para 1×10^6 /mL em RPMI/BSA 0,01%. Exigiu-se viabilidade celular maior ou igual a 97% para o experimento, o que foi definido pela visualização das células pela exclusão, utilizando-se azul de tripan. No compartimento inferior de uma câmara de quimiotaxia (câmara de Boyden; 48 poços; Neuro Probe, Inc., Cabin John, MD – USA) foram adicionados 28,6 μ L dos estímulos fMLP (10^{-7} M/mL) e para controle da migração “ao acaso” utilizou-se o próprio RPMI/BSA 0,01% (Figura 4-A). Colocou-se uma membrana de policarbonato (5 μ m; Poretics Membranes; Osmonics, Laboratory & Specialty Products Group; Livermore, CA-USA) sobre o compartimento inferior (Figura 4-B). Sobre essa membrana, colocou-se uma membrana de polietileno, então encaixado a parte superior da câmara. Em seguida, foram adicionados 50 μ L da suspensão de neutrófilos no compartimento superior, de forma rápida, para evitar formação de bolhas. Essa câmara foi então levada a uma estufa e incubada durante 1 h, à 37°C com CO₂ (Figura 4-C). Após este período, a membrana de policarbonato foi retirada e corada com o kit de coloração Diff-Quik (Baxter Scientific Products; Baxter Health Corporation, McGaw Park, IL –

USA). A membrana foi fixada em lâmina de vidro para contagem de células que migraram e se fixaram na membrana.

A contagem de neutrófilos obedeceu a média aritmética de células contadas em cinco campos aleatório da lâmina e todos os testes foram realizados em duplicada de cada amostra testada para efeito de minimizar erro experimental. Os resultados foram expressos pelo número de neutrófilos por campo.

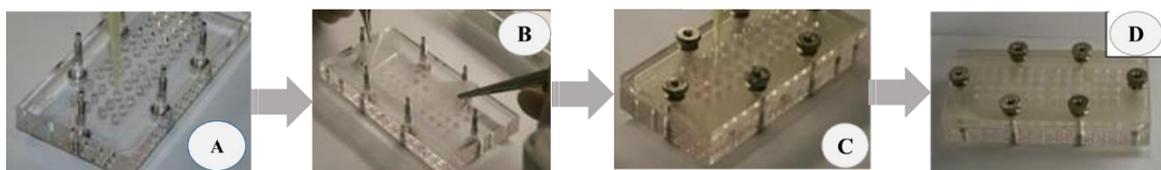


Figura 4: Ensaio de quimiotaxia em câmara de Boyden: Os estímulos quimiotáticos (fMLP) e o meio RPMI são colocados no compartimento inferior da câmara e, na parte superior, os neutrófilos isolados são alíquotados. A câmara é deixada em estufa por uma hora e, em seguida, a membrana inferior é corada para contagem dos neutrófilos através de microscopia.

Cultura de células e análise de apoptose

As células coletadas no primeiro dia de inclusão no estudo foram trabalhadas a fresco para cultura e análise de apoptose. As contagens de células foram determinadas utilizando o citômetro e a viabilidade celular foi verificada por exclusão de azul tripan e, assim, obtivemos viabilidade superior a 96% das células. Em seguida, as células foram semeadas a 5×10^5 células / mL na presença ou ausência de LPS (100 ng / mL) ou RPMI. As amostras de neutrófilos saudáveis e sépticos foram incubadas a 37C por 3h, 6h, 12h, 22h e 24h e meio a RPMI ou LPS. Para realização de leitura de apoptose, adicionamos Annexin V e PI (PE) para avaliar a apoptose e necrose e processadas no citômetro de fluxo FACSCaliber (Leitch, AE, et al; 2010).

Análise estatística:

Os dados obtidos das análises de amostras foram submetidos a análise de variância (One-way ANOVA), seguida do teste Newman-Keuls e foram consideradas diferença estatística significativas se $p < 0.05$. As análises estatísticas e os gráficos foram elaborados através do *software* GraphPad Prism 4.0 e spss. A análise foi realizada por t-tests, nonparametric test (Mann-Whitney) e também foi aplicado para testar a igualdade das medianas e foram consideradas diferença estatística significativas se $p < 0.05$.

Aspectos éticos

Este projeto de pesquisa obedeceu à resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) n° 196/96 que dispõe sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG) como parte adendo ao projeto previamente aprovado e intitulado “Avaliação de marcadores biológicos da sepse de pacientes internados no CTI adulto do HC” em curso por grupo de pesquisadores de linha de pesquisa sobre sepse humana do Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina-UFMG. Número de aprovação: 0319.0.203.000-11. Data da aprovação: 29 de julho de 2014.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.I. Artigo 2

CXCL10, IL6 and NETs are associated with clinical deterioration in human sepsis

Carolina Braga Resende^{1,2}, Barbara Maximino Rezende³, Isabela Borges^{1,2}, Érica Leandro Marciano Vieira⁴, José Carlos Alves Filho⁵, Andrea Jerusa de Souza Santos^{1,2}, Vandack Nobre^{1,2}, Vanessa Pinho³, Mauro Martins Teixeira³.

1- Hospital das Clínicas and School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

2- Núcleo Interdisciplinar de Investigação em Medicina Intensiva (NIIMI), UFMG, Belo Horizonte, Brazil.

3- Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Brazil.

4- Laboratório de Investigação Médica, Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte, Brazil.

5- Escola de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo-SP, Brazil.

Abstract

Background: Sepsis is defined as an uncontrolled host response to the infectious agent. The main scenario in sepsis is an exacerbated inflammation which is in its turn detrimental to the activity of the neutrophils.

Methods: This was a prospective cohort study conducted at an adult Intensive Care Unit of a university hospital in Brazil, from October 2014 to January 2018. Adults (18 years or older) patients with diagnosis of sepsis were assessed for eligibility. Inclusion criteria sepsis-3. Included patients were followed up to one-year after inclusion for survival analysis. The inflammatory profile was evaluated by dosage of serum levels of chemokines and cytokines of septic patient and healthy controls.

Results: Eighty-one patients diagnosed with sepsis were included in the study. The mean age of patients was 59 (18-97) years and 42 (52%) were females. Forty-two (52%) patients had septic shock. The 28-day and 100-day mortality was 20% and 30%, respectively. The median value of severity scores was as following: APACHE 20 (3-34), SAPS 3 65 (6-105) and SOFA 9 (2-18). In the analysis of the inflammatory profile, high levels of CXCL10, CXCL8 and CXCL3 were obtained in the three points analyzed from patients with sepsis as compared to healthy controls ($p < 0.001$ for all analysis). Regarding PTX3 levels, they were higher in septic patients than in healthy controls on D3 ($p = 0.02$). Higher levels of IL-6, IFN- γ TNF α , IL-10 cytokines were detected on D1 in septic patients when compared to healthy volunteers ($p < 0.001$). IL-6 was the only inflammatory molecule associated with septic shock patients, in which its levels were significantly higher than controls ($p < 0.001$). Levels of DNA/NETs were higher in samples from patients with sepsis as compared to controls ($p < 0.001$), and even more in those with septic shock ($p = 0.03$) and in those that deceased throughout the first 7 days after inclusion ($p = 0.03$).

Conclusions: In the analysis of the inflammatory phenomenon that occurs in the pathophysiology of sepsis, we highlight the release of CXCL10 and IL-6 in the inflammatory mechanism and the release of NETs as the main mechanism of microbial control resulting in shock and increased mortality of patients in this cohort.

Keywords: Neutrophil; Sepsis; Cohort; Clinical Study; Chemotaxis; Apoptosis; PTX3; NETs.

Introduction

Sepsis is defined as an uncontrolled host response to the infectious agent, which results in an acute hemodynamic instability and in one or more organ dysfunction (Levy MM *et al.*, 2003; Seymour CW *et al.*, 2016). Organ dysfunction is evidenced by signs such as tissue hypoperfusion, lactic acidosis, oliguria and the presence of neurologic changes such as acute confusion, which occur due to the pathophysiological profile of this condition (Levy MM *et al.*, 2003).

Recently a study by the Latin American Sepsis Institute (ILAS) "SPREAD - Sepsis Prevalence Assessment Database" demonstrated in a multicentric analysis that the prevalence of sepsis was 29.6%, corresponding that 1/3 of the beds of the ICU from all the country were occupied by patients with severe sepsis and shock. In addition to the prevalence, the study highlighted a global lethality of 55% and mortality in the Southeast region of 51.2% (Lancet Infect Dis, 2017). The elevated mortality rates and the high global incidence of sepsis reached a peak in 2017 when it was included as a priority of public health by the World Health Organization (WHO) (<http://www.ilas.org.br/assets/arquivos/upload/Documento-OMS.pdf>).

The pathophysiology of sepsis is characterized by a cascade of events, which includes the innate and adaptive immune responses due to the activation of several types of cells and the release of pro-inflammatory and anti-inflammatory molecules. The unregulated increase in plasma cytokine levels, such as the tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and interleukin 1 β (IL-1 β), has been associated with a poor clinical prognosis because of a hyporesponsiveness secondary to the hyperactivation of defense cells and systems such as, for example, the complement system (Singer M *et al.*, 2004; Cohen J, 2002; Derek CA *et al.* 2013).

The response in the inflammatory phase of sepsis has the deregulation as its main feature and therefore there is a dysfunction of cell activity. Leukocytes have the ability to eliminate the offending agent, for example, neutrophils begin to cause changes in their antimicrobial mechanisms due to hyperactivation. Regarding the neutrophil activity in sepsis, an important line of research has been the study of the release of neutrophil extracellular traps (NETs) that has being described to have the capacity of defend the host from the invasion of microorganisms (Phillipson, M; Kubes, P; 2011). NETs are chromatin fibers released by neutrophils coated with proteases (including elastase) and other antimicrobial molecules (such as histones), and that may be toxic for the host cell (Phillipson, M; Kubes, P; 2011). Neutrophil extracellular traps were associated with the

organ dysfunction picture of sepsis and has been described by its control properties at bacterial invasion in an experimental model of sepsis (Czaikoski, PG, *et al.*, 2016).

Studies investigating the inflammatory response and the neutrophil activity is shown in an experimental model of sepsis and multicenter clinical trials and analyses aim to elucidate certain mechanisms of immune signaling related to sepsis, but in the literature, there is a fragmentation of immune analyses in models of animal sepsis or clinical cases of sepsis. Therefore, it is a considerable challenge to identify these mechanisms in a clinical context impacted by other immune factors, which are self-regulated, to try to identify a pathway that is highlighted in the pathophysiology of sepsis.

There have been a number of studies that have demonstrated increased levels of cytokines related to inflammation in sepsis, such as Bozza *et al* (2007), which demonstrated increased IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, MCP-1 and TNF α in patients who had septic shock. The increase of these cytokines was associated with organ dysfunction and five of these cytokines, such as IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8 and MCP-1, showed increased levels in septic patients who died (Bozza, F *et al.*, 2007).

Thus, we aimed to evaluate the cytokine stimulation profile, neutrophil activity and release of NETs in patients with sepsis.

Methods

Study design

This was a prospective cohort conducted at the adult intensive care unit of Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais (ICU/HC – UFMG), in Brazil. Patients were included from October 2014 to January 2018. Patients with clinical diagnosis of sepsis or septic shock according to the Sepsis 3 criteria (Seymour CW *e cols* 2016); with age \geq 18 years; hospitalized in the adult ICU of the HC / UFMG; and who signed the consent form were included. Exclusion criteria were: patients with a neutrophil count below 500 cels / mm³ or less than 1,000 cels / mm³ associated with a predicted fall of 500 cels / mm³ in the following 48 hours; patients taking corticosteroids with a dose equal to or greater than 2mg / kg / day of prednisone or equivalent drug; patients with a diagnosis of sepsis, but under the use of antibiotics for a period of more than 48 hours; patients with human immunodeficiency virus, with CD4 + <200 cels / mm³; patients undergoing solid organ or tissue transplantation within one year; patients with death predictions for the next 24 hours from the eligibility evaluation.

Definitions and study endpoints

Clinical Data

Data regarding age, gender, type of hospital admission (whether clinical or surgical), site of infection, microbiological confirmation and death were collected. Patients were classified as for their scores for APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II) (Knaus WA e cols; 1985), SAPS 3 (Simplified Acute Physiology Score 3) (Le Gall JR e cols, 1993) and Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) (Vicent JL e cols; 1998) for the analysis of clinical parameter and severity of their condition.

All patients included in the study had a one-year follow-up after the sepsis episode for the survival analysis.

Collection of Biological Material

Blood samples were collected in one day after inclusion. Furthermore, samples were collected on the third (D3) and on the seventh (D7) day after inclusion for test of cytokines and chemokines. Samples were fractionated in a vacuum tube containing heparin for cell analyses and in a vacuum tube containing gel for serological analyses. Blood was obtained by a central catheter or, eventually, by a venipuncture. Samples collected for serological analyses were centrifuged and stored in freezer at -80°C . Health volunteers were included after declaring themselves healthy and not using antibiotics or corticosteroids.

Sample Testing

Blood samples from all patients and control individuals were processed and submitted to the following tests:

Inflammatory markers

Quantification of cytokines and chemokines was performed on the serum of samples from sepsis patients and health volunteers. Serum was obtained by centrifugation and stored at -80°C for posterior analysis. Serum levels of IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-17, CXCL8, CCL2, CXCL10, CCL3, CXCL9, CCL5, and NETs (ELISA in house) and pentraxin-3 (PTX3) were measured by Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA, R&D System for dosage in spectrophotometer) using antibodies of the RD System.

Ninety-six-well plates were covered with $50\mu\text{L}$ /well of a specific antibody and results are expressed in picograms/ mL.

Statistical analysis

The data are reported as means \pm SEM for analysis was carried out by t-tests, nonparametric test (Mann-Whitney) and a test to verify the equality of the medians and they were considered statistically significant when $p < 0.05$. Statistical analyses and graphs were performed using the GraphPad Prism 4.0 and SPSS software.

Ethical aspects

The Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais approved this study, and all included patients provided written informed consent.

Results

Patients

From October 2014 to January 2018, a total of 81 patients were included in the study. Patients' main characteristics are described in Table 1. Mean age of patients was 59 (18-97) and 42 (52%) were females. Most of patients 50 (62%) were admitted due to medical conditions. (**Table 1-A**). Regarding the control group for the laboratory tests, thirty healthy volunteers were included, with a mean age of 55 and 34% were males.

In the classification according to the criteria of Seymour CW *et al.* (2016), there were forty-two cases of septic shock (52% of the total of cases) among the 81 patients with sepsis. Most patients (85%) included in the study had their first sepsis episode.

Most cases of sepsis had a nosocomial origin (74%). Regarding the site of infection, 27 (33%) patients had abdominal infection, followed by 20 (25%) cases of pulmonary infection and 13 (16%) cases of urinary infection. Microbiological confirmation was obtained in forty-eight (60%) cases (**Table 1-B**).

In the analysis of severity scores (SAPS 3, APACHE II, SOFA and Lactate), only SOFA score and lactate were statistically different for patients who died and presented septic shock, respectively (**Figure 1**).

Here were sixteen deaths (20%) in 28 days, twenty-four deaths (30%) in 100 days and thirty-two deaths (40%) one year after detecting sepsis. In one year after the sepsis or septic shock episode, survival was achieved in 60% of cases (**Figure 2**).

Sepsis-related chemokines, pentraxin 3 (PTX3) and cytokines

Chemokines were dosed on the first day (D1), third day (D3) and seventh day (D7) of sepsis after inclusion. There was a high concentration of CXCL8, CXCL10 and CCL3 in the serum of patients with sepsis at the three moments analyzed when compared to healthy people ($p < 0.05$ for all molecules) (**Figure 3 – D, E and F**). CXCL9 was the only

chemokine that did not have changes in the patients when compared to the control healthy people. CCL2 had increased levels on the D7 and CCL5 was increased on the D1; both when compared to healthy volunteers (**Figure 3 – A, B and C**). Finally, PTX was detected in high levels in the D3 of patients with sepsis when compared to healthy volunteers ($p=0.02$) (**Figure 3 – G**).

Regarding the association of these chemokines and sepsis severity (ie, to have septic shock or not) and outcome, only levels of CXCL10 measured on D1 were higher in the group of patients who died in up to one year after the sepsis episode ($p<0.001$). The chemokine and PTX3 were not associated with the severity of sepsis (**Figure 4- A, B, D**). In the analysis of the profile of cytokines, higher levels of IL-6, IFN- γ , TNF- α and IL-10 were obtained in samples of patients with sepsis collected on D1 when compared to healthy volunteers, excepted for IL-17 ($p<0.001$ for all analyses) (**Figure 5 – A, B, C, D, E**). Also, these cytokines were not associated to survival or death in one year after the episode of sepsis neither with the severity of sepsis, only for IL-6 that was increased in patients with septic shock (**Figure 6 – A, B, C, D, E**).

Sepsis-related DNA/NETs

Higher levels of DNA/NETs were detected in samples from patients with sepsis when compared to those samples from healthy volunteers ($p<0.001$) (**Figure 7 – A**). Considering the analysis of samples collected on D1, D3 and D7 after inclusion, only on the latter point the levels of DNA/NETs were associated with sepsis severity or survival ($p=0.04$) (**Figure 7 – B, C, D**).

Discussion

The main findings of this study were, increase of CXCL10, IL-6 and NETs was statistically changed in the subgroup more seriously ill patients and with worse prognosis. The inflammatory profile of patients with sepsis was determined in this study by measuring cytokines and chemokines which are classically related to sepsis. Elevated levels of cytokines and chemokines have been associated with higher mortality as well as other attributes of more severe disease (Fjell, CD et al, 2013). There was an increase of IFN- γ , TFN- α and IL-6, which are released in the early stage of sepsis and are correlated to the activation of endothelial and polymorphonuclear (PMN) cells in this condition (Patel RT, et al, 1994; Petilla V, et al, 2002; Panacek EA, et al, 2004).

Furthermore, the increase of IL-6 was associated with the severity based on the diagnostic criteria of sepsis-3, corroborating data from the literature that suggest that the serum dosage of this cytokine may be a possible marker of septic shock (Petilla V, *et al*, 2002). There was also a serum increase of CXCL10 and CXCL8 in patients with sepsis at the three moments evaluated. These data are relevant, once increased levels of CXCL8 play a role in the activation and migration of neutrophils and CXCL10 contributes to the activation and migration of lymphocytes. Chemokine CXCL8, the former IL-8, was described some time ago and plays a role in the stimulation of neutrophil trafficking through the action of CXCR1 and CXCR2 receptors expressed in the cell membrane of neutrophils (Kunkel SL, 1991).

CXCL10 plays a role in the lymphocyte and natural-killer cells (NK cells) trafficking via CXCR3 receptor and was significantly greater in patients who did not survive, which suggests that the cell hyperactivation from the increase of this chemokine might be significant associated with the mortality of these patients. Patients with sepsis usually have neutrophilia due to the increased stimulation to release cells from the bone marrow to the blood and our data corroborate information from the literature since 70% of patients had neutrophilia (Shen, XF *et al*, 2017).

The increased serum levels of NETs also play a role in the deregulation of the inflammatory response in these patients with sepsis. Czaikoski *et al*. (2016) have already shown the correlation of NETs and bacterial control in an animal model of sepsis through the action of histones and have also shown high levels of this molecule in patients on the first day of sepsis diagnosis. In a clinical trial of NETs, Azzouz, A, *et al.*, (2018) have shown that bacterial control established by the complement system may be changed by the presence of NETs and the bactericidal activity performed by these fibers does not seem to be significant under bacterial infection conditions.

Thus, we have also evaluated whether this molecule might be associated with the worsening and death of patients from our study. There was a significant increase of NETs in patients with sepsis, which is correlated with shock and mortality on the seventh day after detecting the condition.

Some studies have shown that NETs release leads to the increase of another molecule termed PTX3. This molecule, produced by several types of cells including mononuclear phagocytes contributes to the protection against deleterious effects of NETs in the circulation and organ dysfunction associated with the clinical status (Iba T, *et al.*; 2016). In this study, there was also an increased PTX3 on the third day after detecting

sepsis, suggesting an attempt to control impairments associated with the release of NETs. This has a great clinical significance, since the control of NETs in up to seven days after detecting sepsis may be a possible strategy to reduce rates of septic shock and deaths associated with this condition.

Conclusion

In the analysis of the inflammatory phenomenon that takes place in the pathophysiology of sepsis, NETs release is highlighted as the main mechanism of microbial control and that results in shock and increased mortality of patients in this cohort.

Table 1: Baseline demographic and clinical characteristics of the septic patients

A)

	Median	Frequency (n)/
	(Minimum and Maximum)	Percentage (%)
Total patients		81
Age, Median (IQ)	59 (18-97)	
Gender, n (%)		
	Female	42 (52%)
Type of hospitalization, n(%)		
	Medical	50 (62%)
	Surgical	31 (38%)
Surgical hospitalization, n(%)		
	Elective	11(14%)
	Urgency	20 (25%)
Severity score, median - inclusion		
APACHE II (IQ)	20 (3 - 34)	
SAPS III (IQ)	65 (16 - 105)	
SOFA (IQ)	9 (2 - 18)	
LACTATE (IQ)	11 (0.6 – 422)	
PCR (IQ)	282 (55 - 616)	

B)

	Median	Frequency (n)/
	(Minimum and	Percentage (%)
	Maximum)	
Clinical Manifestations		
Sepsis	Sepsis	39 (48%)
	Septic shock	42 (52%)
Sepsis episode		
	First	69 (85%)
	Second	7 (8%)
	Third or more	5 (7%)
Type of infection		
	Nosocomial	60 (74%)
	Community	21 (26%)
Microbiological confirmation		
	Yes	48 (60%)
	No	33 (40%)
infection site		
	Intra-abdominal	27 (33%)
	Lung	20 (25%)
	Kidneys	13 (16%)
	Catheter	5 (6%)
	Others	16 (20%)

Figure 1: Analysis of severity scores with mortality and severity of sepsis

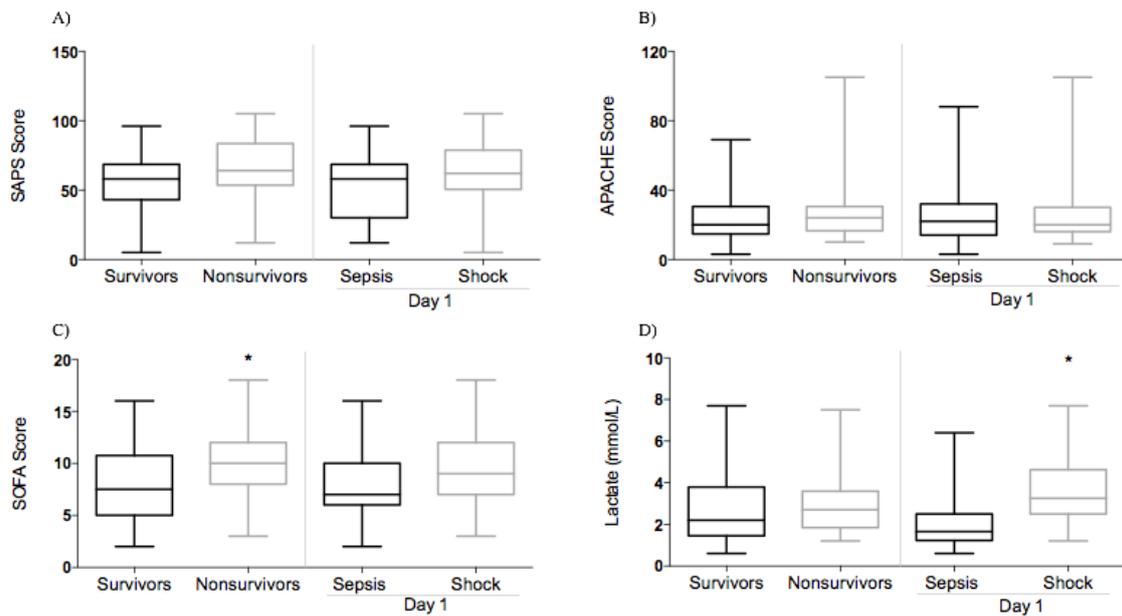


Figure 1: Severity scores (A) SAPS 3, (B) APACHE II, (C) SOFA and (D) lactate in one year. Analysis was carried out by t-tests, nonparametric test (Mann-Whitney) and a test to verify the equality of the medians and they were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Figure 2: Sepsis-related survival

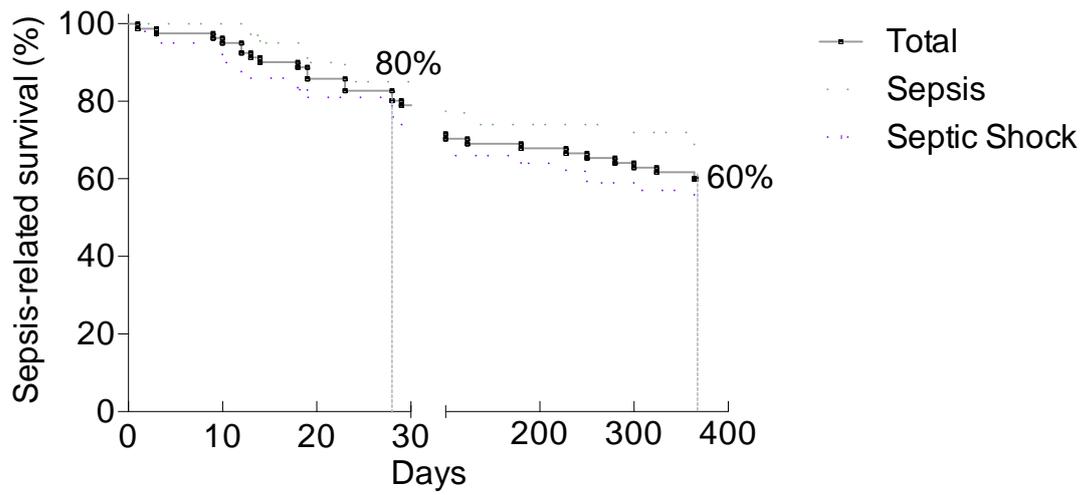


Figure 2: Survival curve of septic patients in one year after event. The survival curve between patients with sepsis and septic shock did not show statistical difference.

Figure 3: Chemokine kinetics

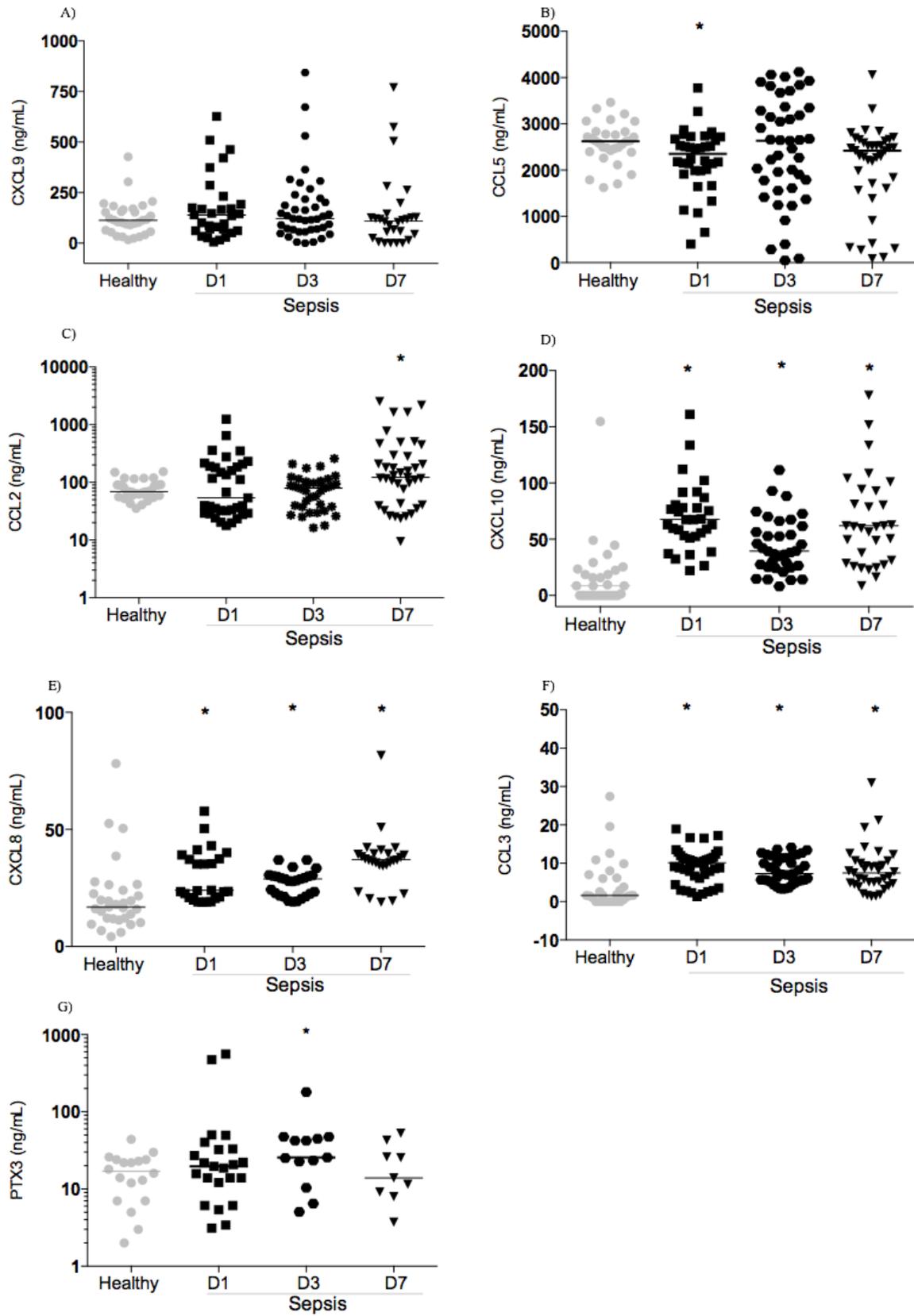


Figure 3: Chemokine kinetics CCL9, CCL5, CCL2, CXCL10, CXCL8, CCL3; and PTX3. First day (D1), third day (D3) and seventh day (D7) of sepsis detection. (*) Analysis was carried out by t-tests, nonparametric test (Mann-Whitney) and a test to verify the equality of the medians and they were considered statistically significant when $p < 0.001$.

Figure 4: Sepsis-related chemokines and pentraxin 3 (PTX3)

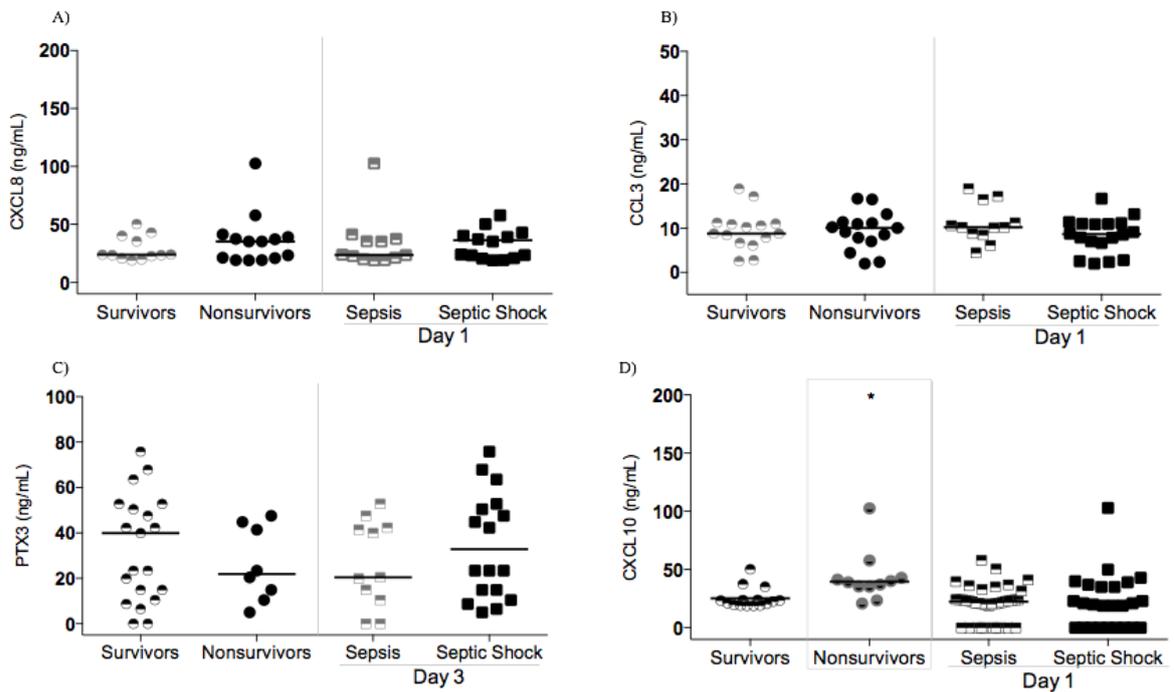


Figure 4: (A, B and D): The Chemokines CXCL10, CXCL8 and CCL3 in first day (D1). (C) PTX3 in third day (D3). (*) Analysis was carried out by t-tests, nonparametric test (Mann-Whitney) and a test to verify the equality of the medians and they were considered statistically significant when $p < 0.001$.

Figure 5: Sepsis-related cytokines

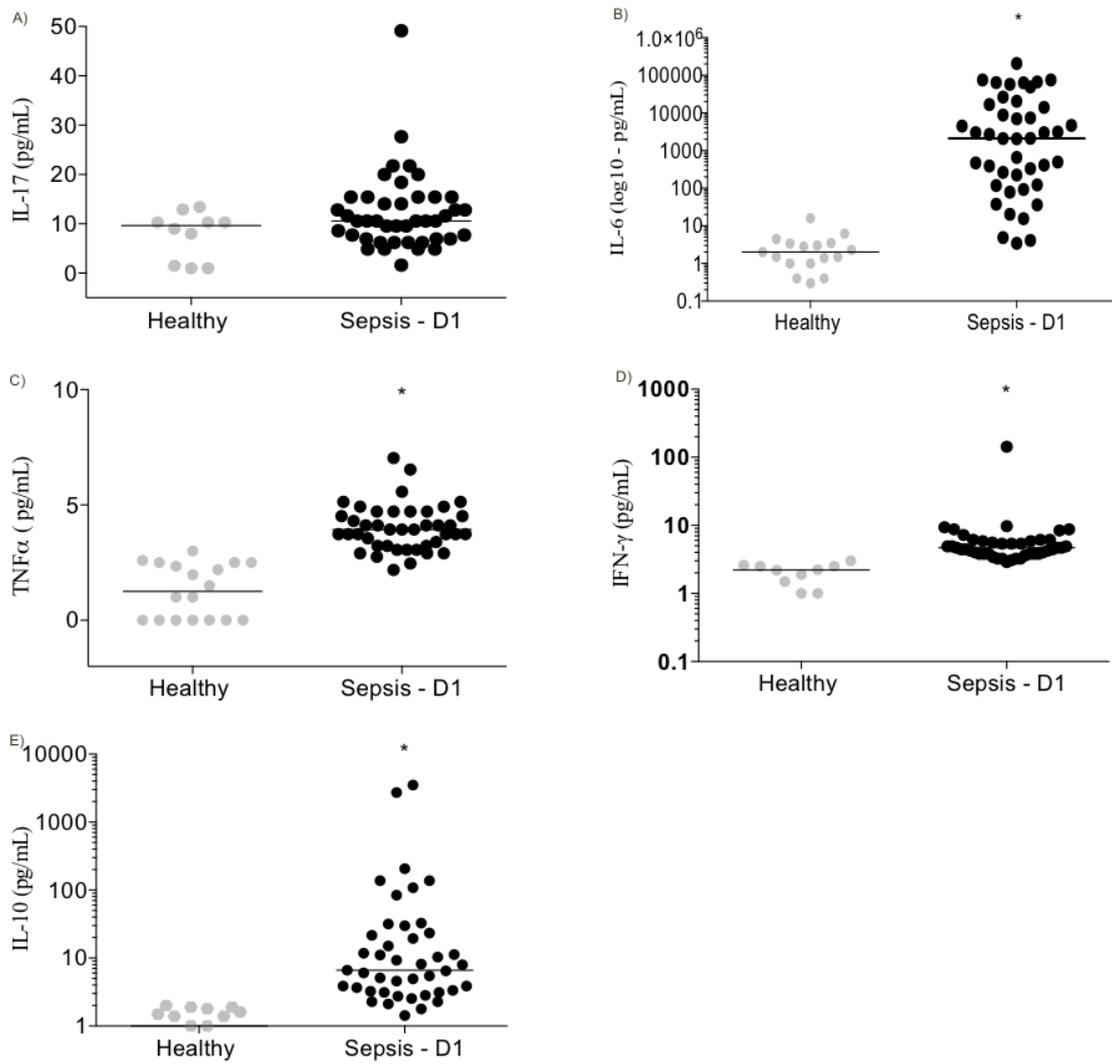


Figure 5: The cytokines IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10 and IL-17 in first day (D1). (*) Analysis was carried out by t-tests, nonparametric test (Mann-Whitney) and a test to verify the equality of the medians and they were considered statistically significant when $p < 0.001$.

Figure 6: Cytokines related to survival and severity of sepsis

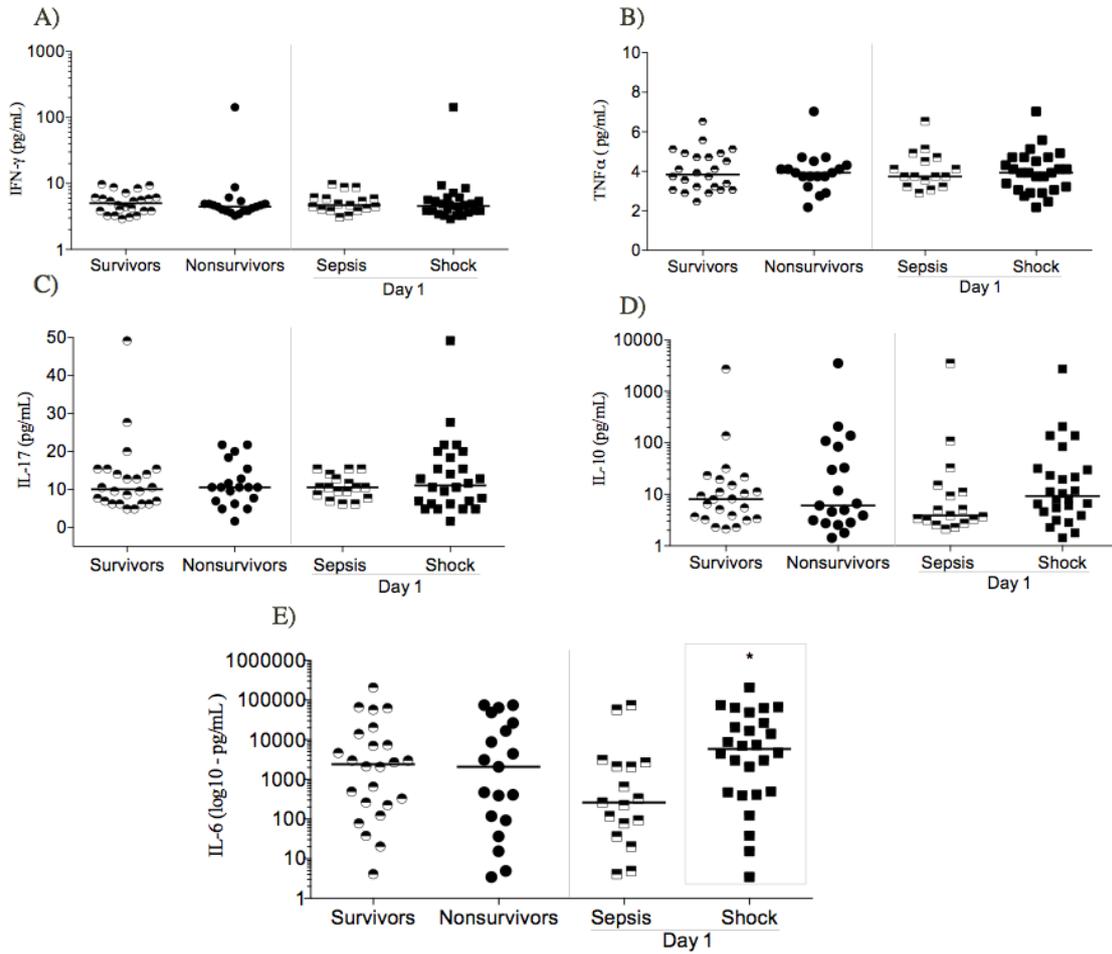


Figure 6: Cytokine profile on the first day of inclusion in the study. The Cytokines: IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10 and IL-17 in first day (D1). (*) Analysis was carried out by t-tests, nonparametric test (Mann-Whitney) and a test to verify the equality of the medians and they were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Figure 7: NETs related to sepsis

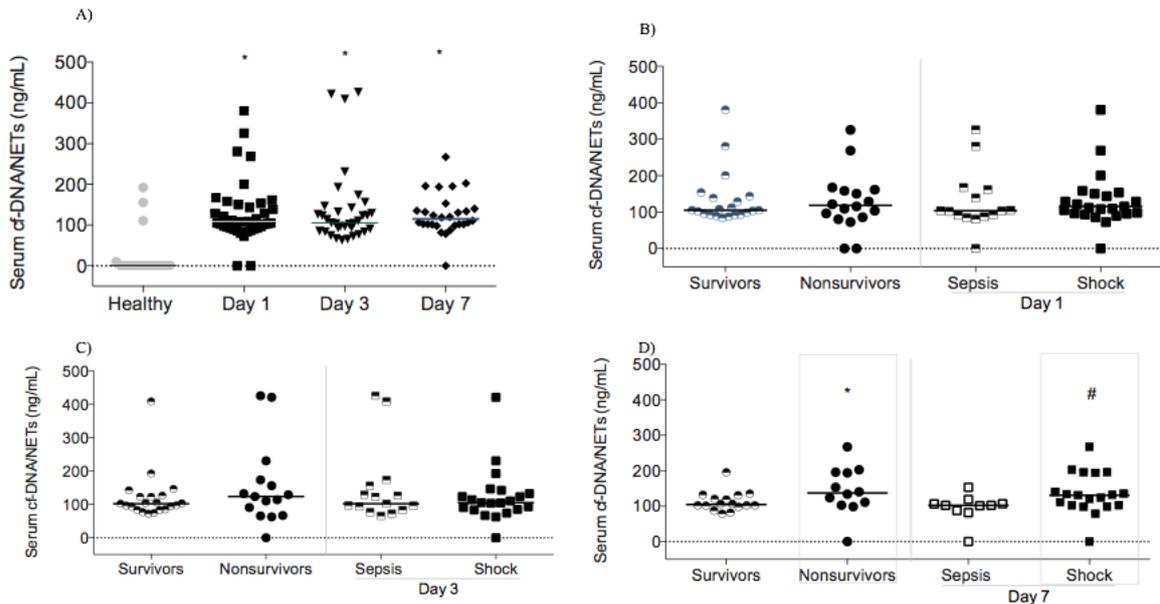


Figure 7: (A): Kinetics of cf-DNA / NETs in samples from patients with sepsis at D1, D3 and D7 times after detection of sepsis ($p < 0.001$). (B, C and D): Analysis of the cf-DNA / NETs profile in relation to the survival and severity of sepsis from the perspective of the three times analyzed in the kinetics (D1, D3, D7) - $p < 0.04$. (*) Analysis was carried out by t-tests, nonparametric test (Mann-Whitney) and a test to verify the equality of the medians and they were considered statistically significant when $p < 0.05$.

V.II Resultados complementares

Os resultados descritos no artigo “**CXCL10, IL6 and NETs are associated with clinical deterioration in human sepsis**” demonstram que os pacientes com sepse e choque séptico da UTI do HC/UFMG apresentam elevados níveis de quimiocinas e citocinas, tais como CXCL10, CXCL8, IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL-10 em relação a voluntários saudáveis demonstrando que há uma estimulação da atividade celular nesse grupo de pacientes com sepse. Em adição a esse dado, destaca-se as NETs como uma importante molécula liberada nestes pacientes nos primeiros dias de sepse (D1, D3 e D7) e com repercussão clínica evidenciada pelo impacto na gravidade da doença e mortalidade através das análises realizadas em sete dias após a detecção da sepse (D7).

Então, a partir destes achados destacados no artigo e pela evidencia científica sugerindo que existem alterações da função dos neutrófilos em pacientes com sepse, avaliamos a contagem total de neutrófilos na corrente sanguínea dos pacientes com sepse no primeiro dia de detecção (D1), realizamos testes preliminares para avaliar a capacidade de migração do neutrófilo sob estímulo quimiotático e a apoptose dessas células. Esses testes foram feitos com neutrófilos procedentes de pacientes com sepse e controles sadios.

Os pacientes com sepse incluídos nesse estudo apresentam neutrofilia (contagem de neutrófilos $> 8 \times 10^3$) demonstrando maior influxo de células da medula óssea para a corrente sanguínea (**figura 5**). Na análise preliminar de quimiotaxia de neutrófilos provenientes de pacientes sépticos (n=9 pacientes), obtivemos uma redução em 60% da capacidade quimiotática de neutrófilos obtidos de pacientes com choque séptico em relação a neutrófilos de voluntários saudáveis (**figura 6**). O dado de redução da quimiotaxia de neutrófilo corrobora dados da literatura e confirma que a desregulação dos níveis de quimiocinas e citocinas que acontece também nesse grupo de pacientes com sepse resulta em perda de resposta do neutrófilo.

Por fim, o neutrófilo hiperestimulado perde a capacidade em migrar e associado a esse quadro também apresenta aumento no tempo de vida médio na corrente sanguínea e essa informação foi comprovada pelo atraso na apoptose de neutrófilos de pacientes com sepse em relação a neutrófilos de voluntários saudáveis (p=0.04) (**figura 7**).

Figure 5: Contagem Total de neutrófilos

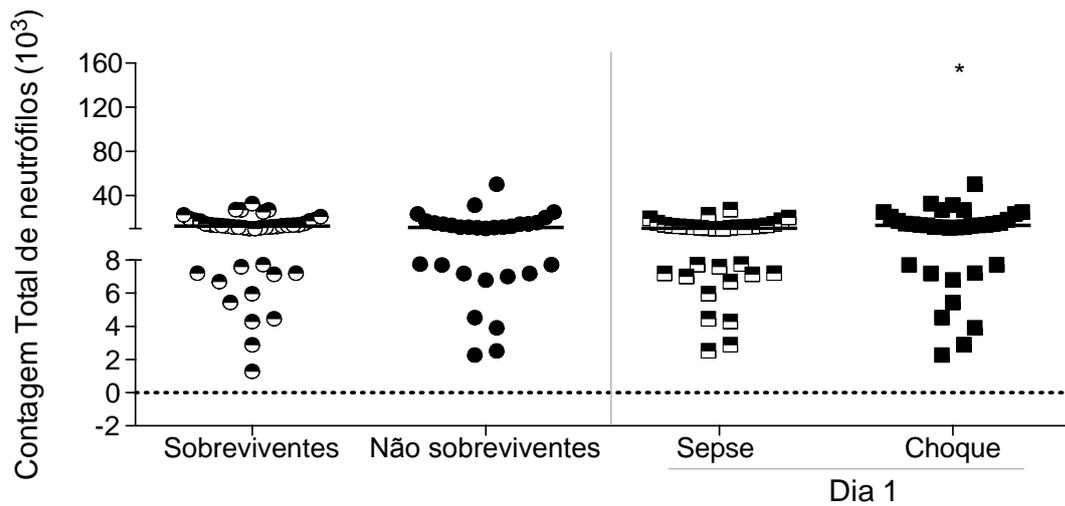


Figure 5: Contagem de neutrófilo total obtido de hemograma dos pacientes com sepse no primeiro dia após detecção da sepse (D1). (*) As análises foram realizadas utilizando teste não paramétrico (Mann-Whitney) e foi considerado diferença estatística para $p < 0.05$.

Figura 6 – Quimiotaxia de neutrófilos

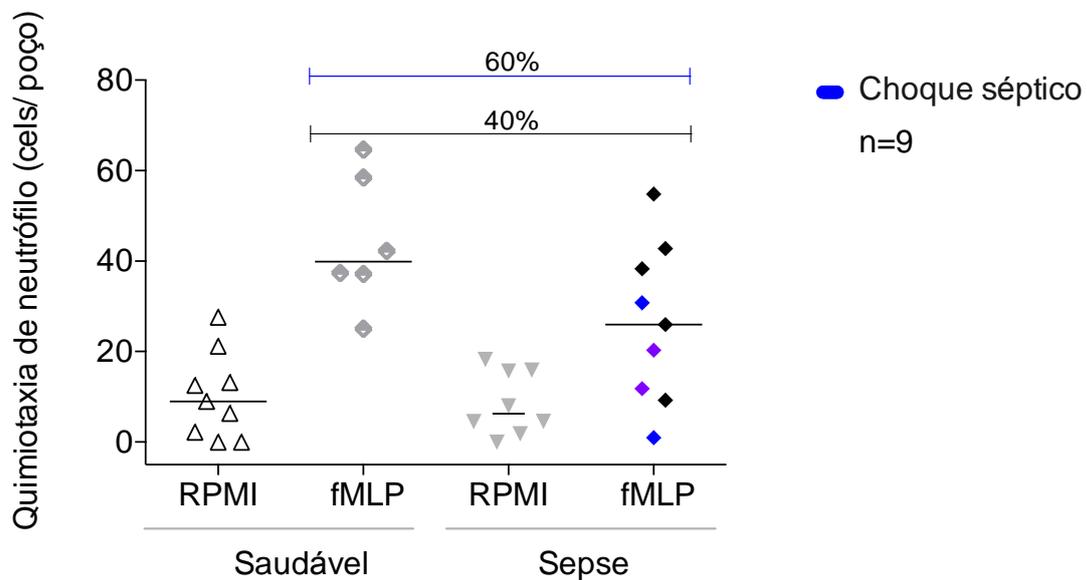


Figure 6: Neutrófilos de pacientes com sepse e de voluntários saudáveis foram colocados em cultura sob o estímulo quimiotático de fMLP e de meio RPMI.

Figura 7 – Apoptose de neutrófilos

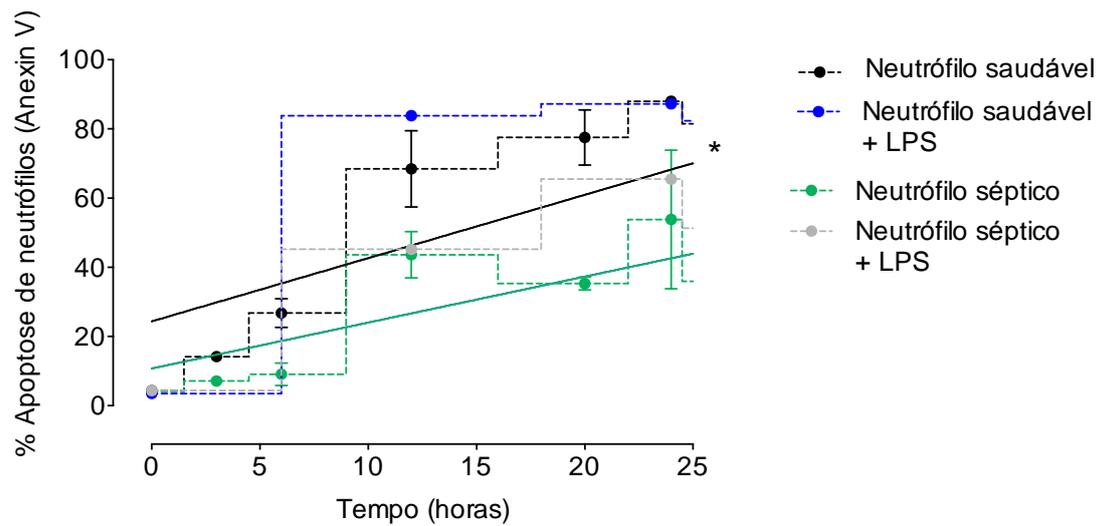


Figure 7: An3lise de apoptose de neutr3filos de pacientes com sepse, neutr3filos de volunt3rios saud3veis e ambos sob estimulo de LPS – $p = 0.04$. (*) As an3lises foram realizadas utilizando teste n3o param3trico (Mann-Whitney) e foi considerado diferen3a estat3stica para $p < 0.05$.

VI. CONCLUSÃO DA TESE

Em um grupo de adultos com sepse, observou-se aumento de quimiocinas e citocinas inflamatórias, redução da quimiotaxia, atraso da taxa da apoptose e aumento das NETs. As alterações de aumento de CXCL10, IL-6 e NETs associado a queda de quimiotaxia e atraso na apoptose celular foi estatisticamente alterada no subgrupo de pacientes mais gravemente enfermo e com pior prognóstico. Assim, destacamos a liberação de CXCL10 e NETs como importante marcador de piora clínica dentro das análises de atividade do neutrófilo de pacientes com sepse.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Abraham E. **New Definitions for Sepsis and Septic Shock: Continuing Evolution but With Much Still to Be Done.** JAMA.2016;315(8):757-759. doi:10.1001/jama.2016.0290.

Alves JC, Spiller F, Cunha FQ. **Neutrophil paralysis in sepsis.** Shock, 2010. 34:15-21.

Alves JC, Freitas A, Souto FO, Spiller F, Paula-Neto H, Silva JS, et al. **Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis.** Proc Natl Acad Sci USA, 2009. 106:4018–23.

Alves JC, Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ. **The role of neutrophils in severe sepsis.** SHOCK, 2008. 3-9.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. **Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care.** Crit Care Med 2001; 29:1303-10.

Arraes SMA, Freitas MS, Silva SV, Neto HAP, Alves JC, Martins MA, et al. **Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation.** Blood, 2006;2906-2913.

Azzouz, A; Cherry, A; Riedl, M; Khan, M; Pluthero, FG; Kahr, WHA; Palaniyar, N; Licht, A. **Relative antibacterial functions of complement and NETs: NETs trap and T complement effectively kills bacteria.** Molecular Immunology. 97 (2018) 71–81.

Balk RA. **Severe sepsis and septic shock.** Crit Care Clin 2000; 16:179–92.

Barreto MF, Dellaroza MS, Kerbauy G, Grion CM. **Sepsis in a university hospital: a prospective study for the cost analysis of patients' hospitalization.** Rev Esc Enferm USP. 2016 Apr;50(2):302-8.

Benjamim CF, Ferreira SH, and Cunha FDQ. **Role of Nitric Oxide in the Failure of Neutrophil Migration in Sepsis.** The Journal of Infectious Diseases, 2000;182:214–23

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

Bozza, FA, Salluh, JI, Japiassu, AM; Soares, M; Assis6, WF; Gomes, RN e cols. **Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis.** Critical Care 2007, 11:R49.

Cantley LC. **The phosphoinositide 3-kinase pathway.** Science, 2002, 296:1655-1657.

Czaikoski, PG; Mota, JM; Nascimento, DC; Sônego, F; Castanheira, FVSP; Melo, PH; Scortegagna, GT; et al. **Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis.** PLOS ONE 2016, PLoS ONE 11(2).

Cohen J. **The immunopathogenesis of sepsis.** Nature 2002; 420:885–91.

Derek C, Poll T. **Severe sepsis and septic shock.** The New England Journal of Medicine. 2013; 369:840-51.

Derek C. Angus, Tom van der Poll. **Severe Sepsis and Septic Shock.** New England Journal Medicine 2013; 369:840-51.

Fjell, CD; Thair, S; Hsu, JL; Walley, KR; Russell, JA; Boyd, J. **Cytokines and Signaling Molecules Predict Clinical Outcomes in Sepsis.** Plos One. 2013, Volume 8.

Freitas A, Alves JC, Victoni T, Secher T, Lemos HP, Sonogo F, Cunha FQ, Ryffel B. **IL-17 Receptor Signaling Is Required to Control Polymicrobial Sepsis.** The Journal of Immunology, 2009; 7846-7854.

Fruman DA e cols. **PI3K-γ inhibitors in the therapeutic intervention of diseases caused by obligate intracellular pathogens.** Semin. Immunol, 2002, 14(1):7-18.

Fruman e Cantley. **Phosphoinositide 3-kinase in immunological systems.** Semin. Immunol, 2002, 14:7-18.

Fuchs, T.A. *et al.* **Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps.** *J. Cell Biol.*, 2007. **176**, 231–24.

Furze RC, Rankin SM. **Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow.** Immunology, 2008; 125, 281–288.

Gupta, A; Liu, T; Shepherd, S; Paiva, W. **Using Statistical and Machine Learning Methods to Evaluate the Prognostic Accuracy of SIRS and qSOFA.** Healthc Inform Res. 2018 April;24(2):139-147.

Heitor APN, Alves JC, Souto FO, Spiller F, Amêndola RS, Freitas A, et al. **Inhibition of guanylyl cyclase restores neutrophil migration and maintains bactericidal activity increasing survival in sepsis.** SHOCK, 2011. 35: 17-27.

Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. **Interleukin 17-producing CD4effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages.** *Nat. Immunol.*, 2005. 6: 1123–1132.

Hotchkiss RS, Karl IE. **The Pathophysiology and Treatment of Sepsis.** *New England Journal Medicine*, 2003; 348:138-150.

Iba T, Hamakubo T, Nagaoka I, Sato K, achil J. **Physiological levels of pentraxin 3 and albumin attenuate vascular endothelial cell damage induced by histone H3 in vitro.** *Microcirculation* (2016) 23(3):240–7. doi:10.1111/ micc.12269.

Instituto Latino Americano de sepsis (ILAS). "SPREAD - Sepsis Prevalence Assessment Database". Artigo aceito no *Lancet*, 2018. acessado em 21 de maio, 2018. <http://www.ilas.org.br/spread.php>

James D Faix. **Biomarkers of sepsis.** *Critical Reviews Clinical Laboratory Science*, 2013; 50(1): 23–36.

Konrad R, Bauer M, Riedemann NC, Hartoga CS. **New Approaches to Sepsis: Molecular Diagnostics and Biomarkers.** *Clinical Microbiology Reviews*, 2012. 609–634.

Kumar, A; Roberts, D; Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, e cols. **Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock.** *Critical Care Medicine*, 2006. 34(6): 1589-96.

Laan, M., Z H. Cui, H. Hoshino, J. Lotvall, M. Sjostrand, D. C. Gruenert, B. E. Skoogh, and A. Linden. **Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways.** *J. Immunol.*, 1999. 162: 2347–2352.

Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. **A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study.** *JAMA*. 1993;270(24):2957-63.

Barros, LLS, Maia, CFS, Monteiro, MC. **Fatores de risco associados ao agravamento de sepsis em pacientes em Unidade de Terapia Intensiva.** *Cad. Saúde Colet.*, 2016, Rio de Janeiro, 24 (4): 388-396.

Knaus WA, Draper EA, Wagner DP. **APACHE II: a severity of disease classification system.** *Crit Care Med*. 1985;13(10):818-29.

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. **SSCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference.** Crit Care Med 2003; 31: 1250–56.

Leliefeld PHC, Wwsswls CM, Leenden LPH, Koenderman L, Pillay J. **The role of neutrophils during severe inflammation.** Critical Care, 2016.

Machado RF, Souza PH, **Sepse: um problema da Saúde Pública.** Instituto Latino Americano para Estudos da Sepse (ILAS). Conselho Federal de Medicina. 2015.

Machado RF, Calvalcanti AB, Bozza FA, Ferreira EM, Carrara FSA, Souza JL, Caixeta N, Salomao R, Angus DC, Azevedo LCP. **The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study.** The lancet infectious diseases, 2017.17: 1180-1189.

Martin EL, Souza DG, Fagundes CT, Amaral FA, Assenzio B, Puntorieri V, et al. **Phosphoinositide-3 kinase gamma activity contributes to sepsis and organ damage by altering neutrophil recruitment.** Am J Respiratory Critical Care Medicine, 2010. 182:762–73.

Marcos, V. et al. **CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic brosis airway in ammation.** *Nat. Med.*, 2010. 16, 1018–1023.

Park, H., Z. et al. **A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17.** *Nat. Immunol.*, 2005. 6: 1133–1141.

Phillipson, M; Kubes, P. **The neutrophil in vascular inflammation.** *Nature medicine* Novembro, 2011; volume, 17.

Pilszczek, F.H. et al. **A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*.** *J. Immunol.*, 2010. 185, 7413–7425.

Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, et al. **Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock.** *N Engl J Med* 2012; 366:2055-64.

Sales JAL, David CM, Hatum R, et al. **Sepse Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepse em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras.** *RBTI - Revista Brasileira Terapia Intensiva.* 2006; 18:9-17.

Santos FR, Alves JC, Souto FO, Spiller F, Freitas A, Monteiro C, et al. **Down-regulation of CXCR2 on Neutrophils in Severe Sepsis Is Mediated by Inducible Nitric Oxide Synthase–derived Nitric Oxide.** *Am J Respiratory Critical Care Medicine,* 2007. 175: 490–497.

Shen, XF; Cao, K; Jiang, JP; Guan, WX; Du, JF. **Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update.** J. Cell. Mol. Med. Vol 21, No 9, 2017 pp. 1687-1697.

Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, et al. **Assessment of clinical criteria for sepsis: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3).** JAMA. doi:10.1001/jama.2016.0288.

Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, et al. **Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3).** JAMA. doi:10.1001/jama.2016.0289.

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. **The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3).** JAMA. doi:10.1001/jama.2016.0287.

Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeff coate W. **Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation.** Lancet 2004; 364: 545–48.

Sogayar AM, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grion CM, Lobo SM, et al. Costs Study Group – Latin American Sepsis Institute. **A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units.** Pharmacoeconomics. 2008;26(5):425-34.

Secher T, Vasseur V, Poisson DM, Mitchell JA, Cunha FQ, Alves JC, Ryffel B. **Crucial Role of TNF Receptors 1 and 2 in the Control of Polymicrobial Sepsis.** The Journal of Immunology, 2009; 7855-7864.

Sônego F, Castanheira FVS , Ferreira RG, Kanashiro A , Leite CABVG , Nascimento D. **Paradoxical Roles of the neutrophil in Sepsis: Protective and Deleterious.** Mini Review. Frontiers Immunology, 2016; 7:155.

Vincent JL, Rello J, Marshall J, et al. **International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units.** JAMA 2009; 302:2323-9.

Vicent JL, Mendonça A, Cantraine F e cols. **Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study.** Working group on ‘sepsis-related problems’ of the European Society of Intensive Care Medicine. Crit Care Med. 1998; 26(11): 1793-1800.

Ye, P., F. H. et al. **Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense.** *J. Exp. Med.* 2001. 194: 519–527.

Youse , S. et al. **Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense.** *Nat. Med.*, 2008. **14**, 949–953.

Youse , S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I. & Simon, H.U. **Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps.** *Cell Death Differ*, 2009. **16**, 1438–1444.

Wang, Y. et al. **Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation.** *J. Cell Biol.*, 2009. **184**, 205–213.

Witowski, J., K. Pawlaczyk, A. Breborowicz, A. Scheuren, M. Kuzlan-Pawlaczyk, J. Wisniewska, A. Polubinska, H. Friess, G. M. Gahl, U. Frei, and A. Jorres. **IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO chemokine from mesothelial cells.** *J. Immunol.*, 2000. 165: 5814–5821.

Patel RT, et al. **Interleukin-6 is a prognostic indicator of outcome in severe intraabdominal sepsis.** *Br J Surg* 1994;81:1306–8.

Petilla V, et al. **Predictive value of procalcitonin and interleukin 6 in critically ill patients with suspected sepsis.** *Intensive Care Med* 2002;28:1220–5.

Panacek EA, et al. **Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody Fab'2 fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels.** *Crit Care Med* 2004;32:2173–82.

Kaukonen KM, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA*. 2014. Apr 2;311(13):1308-16. PubMed PMID: 24638143.

Kunkel SL, Standiford T, Kasahara K, Strieter RM. **Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung.** *Exp Lung Res.* 1991;17(1):17-23.

World Health Organization (WHO) acessado em: junho, 2018. Disponível: <http://www.ilas.org.br/assets/arquivos/upload/Documento-OMS.pdf>.

ANEXOS

ANEXO I: Carta de Aprovação COEP/ UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 0319.0.203.000-11

Interessado(a): **Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.**
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP analisou e aprovou, no dia 29 de julho de 2014, as alterações, abaixo relacionadas, no projeto de pesquisa intitulado "**Estudo da função endotelial e cardiovascular em pacientes portadores de sepse: implicações diagnósticas, definição de risco e terapêutica**":

1. Avaliação oftalmológica completa; exame clínico, realizado por oftalmologista, no próprio CTi, ou seja, sem necessidade de transporte do paciente para o setor de oftalmologia;
2. Coleta de sangue total para separação de:
 - 2.1 Células mononucleares do sangue periférico (CMSP): avaliar a apoptose celular e viabilidade dessas células, bem como características da via do inflamossoma e da produção de citocinas in vitro (os resultados serão correlacionados com a gravidade e prognóstico dos pacientes);
 - 2.2 Neutrófilos; este estudo pretende avaliar o perfil de ativação e capacidade de migração de neutrófilos, avaliar vias de sinalização da P13K nos neutrófilos através de marcação de atividade de Akt/PKB e sua fosforilação e, por fim, avaliar o efeito do tratamento de inibidores na via da P13K no recrutamento de neutrófilos provenientes de pacientes com sepse;
 - 2.3 estudo da função dos neutrófilos na sepse através da realização de ensaios de marcadores de membrana celular e de moléculas relacionadas à via de sinalização da P13K;
3. Dosagem de alguns micro RNAs (miRNA 150, miRNA 574-5p, miRNA 133^a e miRNA 193b) no plasma, que serão testados em relação à gravidade da sepse e ao prognóstico dos pacientes;
4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para familiar ou responsável;
5. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o paciente.

A aprovação é válida por dois anos (de 29 de julho de 2014 a 28 de julho de 2017).

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo II: Carta de submissão da revisão sistemática

Journal Office <onbehalf@manuscriptcentral.com>

14 de junho de 2018
22:00

Responder a: bjournal@terra.com.br

Para: carolbresende@gmail.com

Cc: carolbresende@gmail.com, isabelanborges@hotmail.com, williamt_wilson@hotmail.com,
rafaelcarneiro29@gmail.com, barbaramaximinorez@gmail.com, vpinhos@gmail.com,
vandack@gmail.com, mmtex.ufmg@gmail.com

14-Jun-2018

Dear Dr. Resende,

Your manuscript entitled "Neutrophil activity in sepsis: a systematic review" will be sent to the editor of the Brazilian Journal.

You may check on the status of this manuscript by selecting the "Author Center" link under the following URL:

<https://mc04.manuscriptcentral.com/bjmr-scielo>

(Press/Click on the above link to be automatically sent to the web page.)

Thank you for submitting your paper to the Brazilian Journal of Medical and Biological Research.

Sincerely,

Journal Office
Brazilian Journal of Medical and Biological Research

APÊNDICE I: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA O PACIENTE)

PROJETO DE PESQUISA: ESTUDO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL E CARDIOVASCULAR EM PACIENTES PORTADORES DE SEPSE: IMPLICAÇÕES DIAGNÓSTICAS, DEFINIÇÃO DE RISCO E TERAPÊUTICA

Pesquisador responsável: Vandack Alencar Nobre Jr

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

A Universidade Federal de Minas Gerais convida o Sr. / a Sra. a participar de uma pesquisa sobre infecções graves (septicemia) causadas por bactérias. Muitas questões sobre esse tipo de doença permanecem desconhecidas pelos médicos. As infecções graves são motivo de diversas pesquisas no mundo todo. Os pesquisadores do Hospital das Clínicas da UFMG estão propondo uma pesquisa sobre essa doença. Trata-se de um projeto para conhecer melhor o problema e tentar descobrir formas de diagnosticá-lo mais rapidamente e tratar melhor os pacientes.

Sabe-se que nos pacientes com septicemia ocorre uma significativa inflamação. Vários exames realizados no sangue podem ajudar a descobrir se esta inflamação está muito intensa e se terá maiores conseqüências. Além disso, o funcionamento de vários órgãos fica prejudicado quando o paciente tem uma infecção grave. Os pesquisadores da UFMG querem estudar o funcionamento do coração, dos vasos sanguíneos e do sistema neurológico nesses pacientes, utilizando exames que são feitos por cima da pele, e não doem, coleta de sangue para exames e avaliação clínica padronizada realizada por profissional capacitado. Este profissional aplicará alguns questionários e testes para investigar a presença de alterações da força muscular, da capacidade de raciocínio, da memória, da atenção e do comportamento. Não haverá nenhuma mudança no seu tratamento se você participar da pesquisa. Além disso, não se prevê benefícios diretos para você, caso você participe.

Se você aceitar participar, serão coletadas amostras de seu sangue diariamente, juntamente com a coleta realizada todos os dias para exames de rotina. O sangue será enviado para o Laboratório do Hospital das Clínicas, onde serão realizadas dosagens de várias substâncias. Essas substâncias poderão ajudar a entender melhor o funcionamento do corpo nas infecções graves. Além disso serão separados dois tipos de células do sistema de defesa contra infecções, as quais serão testadas em laboratório. Os pesquisadores querem saber como essas células estão funcionando. Essas células não

serão utilizadas para qualquer tipo de procedimento do tipo clonagem ou algo parecido. Por fim, o sangue dos pacientes não será utilizado para outros fins e será descartado após os exames da pesquisa.

Os procedimentos propostos nesta pesquisa e os seus respectivos riscos são os seguintes:

1. Coleta de sangue: procedimento feito rotineiramente nos pacientes internados no CTI.

A coleta de sangue apresenta riscos mínimos e pode causar:

- hematomas no local de coleta
- infecção no local de coleta

2. Ecocardiograma bidimensional: também frequentemente realizado em pacientes internados. Trata-se de exame não invasivo e que não traz qualquer risco ao paciente. Pode haver pequeno desconforto devido ao posicionamento do paciente, que às vezes deve ficar deitado de lado.

3. Aplicação de questionários e testes: sua aplicação não traz constrangimentos ao paciente e o único incômodo refere-se ao tempo de duração da entrevista, que pode durar aproximadamente 60 minutos. Esses testes só serão realizados a partir do momento em que o paciente apresente condições clínicas gerais melhores, para não deixá-lo fadigado.

Os pesquisadores assumem o dever de dar assistência aos participantes da pesquisa para problemas relacionados aos procedimentos citados acima ou mesmo para quaisquer outros problemas da saúde apresentados durante a pesquisa.

Os registros (informações dos pacientes) serão mantidos de forma confidencial com códigos de identificação de acesso limitado e o nome do paciente não será mencionado em nenhum momento.

Eu tenho o direito de recusar ou cancelar o meu consentimento de participação a qualquer instante, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado, bastando comunicar a minha decisão aos organizadores da pesquisa.

EU, _____,

ENTENDI O QUE ME FOI PROPOSTO E TIVE OPORTUNIDADE DE ESCLARECER MINHAS DÚVIDAS. ESTOU CIENTE E CONSINTO QUE SE REALIZE COLETA DE SANGUE (50 ML DE SANGUE AO TODO). SEI QUE OS RESULTADOS DO ESTUDO SERÃO MANTIDOS EM SIGILO, PODENDO SER INFORMADOS SOMENTE A MINHA PESSOA. ESTOU CIENTE DE QUE OS

RESULTADOS SERÃO PUBLICADOS SOMENTE EM CONJUNTO, NÃO PERMITINDO A IDENTIFICAÇÃO INDIVIDUAL.

Belo Horizonte, ___/___/_____

Assinatura

Impressão digital (se analfabeto – nesse caso ler o consentimento em voz alta após explicá-lo)

Pesquisador responsável

Os telefones abaixo podem lhe ser úteis para esclarecimentos:

Pesquisadores:

1-Dr. Vandack Alencar Nobre Jr (Hospital das Clínicas): (31) 3409-9436 / 9831-0004

Av. Alfredo Balena, 190 – Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG – Santa Efigênia – Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 30130-100.

Alunos de Mestrado e Doutorado responsáveis:

1- Carolina Braga de Resende (Hospital das Clínicas): (31) 3409-9626.

Av. Alfredo Balena, 190 – Centro de Terapia Intensiva do HC UFMG – Santa Efigênia – Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 30130-100.

2-Isabela Borges (Hospital das Clínicas): (31) 3409-9626.

Av. Alfredo Balena, 190 – Centro de Terapia Intensiva do HC UFMG – Santa Efigênia – Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 30130-100.

Comitês de Ética em Pesquisa:

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP: Telefax (31) 3409-4592

Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar, sl 2005 – Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 31270-901

APÊNDICE II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Para o familiar)

Projeto de pesquisa: Estudo da função endotelial e cardiovascular em pacientes portadores de sepse: implicações diagnósticas, definição de risco e terapêutica

Pesquisador responsável: Vandack Alencar Nobre Jr

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

A Universidade Federal de Minas Gerais convida o(a) seu(sua) familiar / amigo(a) a participar de uma pesquisa sobre infecções graves (septicemia) causadas por bactérias. Muitas questões sobre esse tipo de doença permanecem desconhecidas pelos médicos. As infecções graves são motivo de diversas pesquisas no mundo todo. Os pesquisadores do Hospital das Clínicas da UFMG estão propondo uma pesquisa sobre essa doença. Trata-se de um projeto para conhecer melhor o problema e tentar descobrir formas de diagnosticá-lo mais rapidamente e tratar melhor os pacientes.

Sabe-se que nos pacientes com septicemia ocorre uma significativa inflamação. Vários exames realizados no sangue podem ajudar a descobrir se esta inflamação está muito intensa e se terá maiores conseqüências. Além disso, o funcionamento de vários órgãos fica prejudicado quando o paciente tem uma infecção grave. Os pesquisadores da UFMG querem estudar o funcionamento do coração, dos vasos sanguíneos e do sistema neurológico nesses pacientes, utilizando exames que são feitos por cima da pele, e não doem, coleta de sangue para exames e avaliação clínica padronizada realizada por profissional capacitado. Este profissional aplicará alguns questionários e testes para investigar a presença de alterações da força muscular, da capacidade de raciocínio, da memória, da atenção e do comportamento. Não haverá nenhuma mudança no tratamento se ele(ela) participar da pesquisa. Além disso, não se prevê benefícios diretos, caso ele(ela) participe.

Se você autorizar a participação do(a) seu(sua) familiar / amigo(a), serão coletadas amostras de seu sangue diariamente, juntamente com a coleta realizada todos os dias para exames de rotina. O sangue será enviado para o Laboratório do Hospital das Clínicas, onde serão realizadas dosagens de várias substâncias. Essas substâncias poderão ajudar a entender melhor o funcionamento do corpo nas infecções graves. Além disso serão separados dois tipos de células do sistema de defesa contra infecções, as quais serão testadas em laboratório. Os pesquisadores querem saber como essas células estão funcionando. Essas células não serão utilizadas para qualquer tipo de procedimento do

tipo clonagem ou algo parecido. Por fim, o sangue dos pacientes não será utilizado para outros fins e será descartado após os exames da pesquisa.

Os procedimentos propostos nesta pesquisa e os seus respectivos riscos são os seguintes:

1. Coleta de sangue: procedimento feito rotineiramente nos pacientes internados no CTI.

A coleta de sangue apresenta riscos mínimos e pode causar:

- hematomas no local de coleta
- infecção no local de coleta

2. Ecocardiograma bidimensional: também frequentemente realizado em pacientes internados. Trata-se de exame não invasivo e que não traz qualquer risco ao paciente. Pode haver pequeno desconforto devido ao posicionamento do paciente, que às vezes deve ficar deitado de lado.

3. Aplicação de questionários e testes: sua aplicação não traz constrangimentos ao paciente e o único incômodo refere-se ao tempo de duração da entrevista, que pode durar aproximadamente 60 minutos. Esses testes só serão realizados a partir do momento em que o paciente apresente condições clínicas gerais melhores, para não deixá-lo fadigado.

Os pesquisadores assumem o dever de dar assistência aos participantes da pesquisa para problemas relacionados aos procedimentos citados acima ou mesmo para quaisquer outros problemas da saúde apresentados durante a pesquisa.

Os registros (informações dos pacientes) serão mantidos de forma confidencial com códigos de identificação de acesso limitado e o nome do paciente não será mencionado em nenhum momento.

Eu tenho o direito de recusar ou cancelar o meu consentimento de participação a qualquer instante, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado, bastando comunicar a minha decisão aos organizadores da pesquisa.

EU, _____,

_____ DO(A) PACIENTE _____ ENTENDI

O QUE ME FOI PROPOSTO E TIVE OPORTUNIDADE DE ESCLARECER MINHAS DÚVIDAS. ESTOU CIENTE E CONSINTO QUE SE REALIZE COLETA DE SANGUE (50 ML DE SANGUE AO TODO). SEI QUE OS RESULTADOS DO ESTUDO SERÃO MANTIDOS EM SIGILO, PODENDO SER INFORMADOS SOMENTE AO MEU(MINHA) FAMILIAR / AMIGO(A). ESTOU CIENTE DE QUE

OS RESULTADOS SERÃO PUBLICADOS SOMENTE EM CONJUNTO, NÃO PERMITINDO A IDENTIFICAÇÃO INDIVIDUAL.

Belo Horizonte, ___/___/_____

Assinatura

Impressão digital (se analfabeto – nesse caso ler o consentimento em voz alta após explicá-lo)

Pesquisador responsável

Os telefones abaixo podem lhe ser úteis para esclarecimentos:

Pesquisadores:

1-Dr. Vandack Alencar Nobre Jr (Hospital das Clínicas): (31) 3409-9436 / 9831-0004

Av. Alfredo Balena, 190 – Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG – Santa Efigênia – Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 30130-100

Alunos de Mestrado e Doutorado responsáveis:

1- Carolina Braga de Resende (Hospital das Clínicas): (31) 3409-9626.

Av. Alfredo Balena, 190 – Centro de Terapia Intensiva do HC UFMG – Santa Efigênia – Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 30130-100.

2- Isabela Borges (Hospital das Clínicas): (31) 3409-9626.

Av. Alfredo Balena, 190 – Centro de Terapia Intensiva do HC UFMG – Santa Efigênia – Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 30130-100.

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP: Telefax (31) 3409-4592

Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar, sl 2005 – Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 31270-901

APÊNDICE III: Ficha de Registro Clínico

Coorte Sepsis – Fase II	
1-VARIÁVEIS SÓCIO-DEMOGRÁFICAS	
1.1-Nome:	
1.2-Iniciais: _____	I _ I _ I _ I _ I
1.3- Número inclusão estudo: _ _ _ _	I _ I _ I _ I
1.4 – Inclusão citometria e quimiotaxia: __ <i>0 – não 1 – sim</i> Motivo não inclusão: _____	I _ I
1.5 – Número inclusão citometria e quimiotaxia: __	I _ I _ I
1.6- Data inclusão estudo: __ __ / __ __ / __ __	I _ I _ I _ I _ I _ I _ I
1.7- SAME: _ _ _ _ _ _ _ _	I _ I _ I _ I _ I _ I _ I _ I
1.8- Data de nascimento: __ __ / __ __ / __ __	I _ I _ I _ I _ I _ I _ I
1.9- Data internação HC: __ __ / __ __ / __ __	I _ I _ I _ I _ I _ I _ I
1.10- Data internação CTI: __ __ / __ __ / __ __	I _ I _ I _ I _ I _ I _ I
1.11- Data alta HC: __ __ / __ __ / __ __	I _ I _ I _ I _ I _ I _ I
1.12- Data alta CTI: __ __ / __ __ / __ __	I _ I _ I _ I _ I _ I _ I
1.13- Sexo: __ <i>1- M 2- F</i>	I _ I
Contatos telefônicos: Fixo: (__ __) _____ Celular: (__ __) _____ Contato alternativo: Nome: _____ Tel1: (__ __) _____ Tel2: (__ __) _____ Endereço: Rua/Av: _____ No.: _____ Complemento: _____ Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: __ __ . __ __ __ __ - __ __ __ __	Observações :
2-VARIÁVEIS CLÍNICAS À INCLUSÃO	
2.1 - Tipo de internação: __ <i>1. Clínica 2. Cirúrgica (pós ou pré- imediato de cirurgia eletiva ou urgência)</i>	I _ I

2.2 - Principal causa internação clínica em CTI <i>1. Insuf. respiratória 2. Insuf. cardíaca 3. Choque 4. Coma 5. Distúrbio hidroeletrólítico 6. Insuf. renal 7. SCA 8. PO cirurgia complicado fora do CTI 9. NSA Outras: _____</i>	I__I
2.3 - Principal causa internação cirúrgica: __ <i>1. PO cirurgia urgência 2. PO eletivo alto-risco 9. NSA Sítio cirúrgico: _____</i>	I__I
2.4 – Localização prévia: <i>1. Urgência 2. Outro CTI 3. Bloco 4. Enfermaria 5. Outro 9. NSA</i>	I__I
2.5 – Uso de drogas vasoativas previamente a admissão em CTI: <i>0- não 2- sim 8- IGN</i>	I__I
2.6- APACHE II: __ __	I__I__I
2.7 – SAPS 3 admission Score: __ __ __	I__I__I__I
2.8- SOFA total: __ __	I__I__I
2.9- SOFA respiratório: __ PaO ₂ /FiO ₂ :	I__I
2.10- SOFA coagulação: __ Plaquetas:	I__I
2.11- SOFA hepático: __ Bilirrubina:	I__I
2.12- SOFA cardiovascular: __ PAM: Aminas:	I__I
2.13- SOFA neurológico: __ ECG:	I__I
2.14- SOFA renal: __ Creatinina:	I__I
2.15 – Episódio índice de sepse: __ 1. Primeiro episódio 2. Segundo episódio 3. Terceiro ou mais episódio	I__I
3-HISTÓRIA PREGRESSA/COMORBIDADES	
3.1- Insuficiência cardíaca congestiva (NYHA ≥ II e/ou FE < 40%): __ <i>0- não 1-sim 8- IGN</i>	I__I
3.2 História de neoplasia sólida ativa: __ <i>0- não 1-sim 2- sim e sob tratamento 8- IGN</i>	I__I
3.3 História de neoplasia hematológica ativa: __ <i>0- não 1-sim 2 – sim e sob tratamento 8- IGN</i>	I__I
3.4 História confirmada (relatório, exames) de doença neuro-degenerativa: __ <i>0- não 1-sim 8- IGN</i>	I__I
3.5- DPOC: __ <i>0- não 1-sim 8- IGN</i>	I__I
3.6- Cirrose hepática (confirmada, por ex., em seguimento ambulatorial específico): __ <i>0- não 1-sim 8- IGN</i>	I__I
3.7- Insuficiência renal crônica não Dialítica (Clearance < 60ml/min): __ <i>0- não 1-sim 8- IGN</i>	I__I
3.8- Insuficiência renal crônica Dialítica: __	I__I

0- não 1-sim 8- IGN	
3.9- HAS: __ 0- não 1-sim 8- IGN	I__I
3.10- Diabetes mellitus: __ 0- não 1-sim 8- IGN	I__I
3.11- Uso de corticoides (referência ≥15mg/dia prednisona): __ 0- não 1-sim 8- IGN	I__I
3.12- Uso de imunossupressores: __ 0- não 1 - sim 8- IGN	I__I
3.13 – Infecção HIV (cels. CD4+ > 200): __ 0- não 1-sim 8- IGN	I__I
4 - DADOS MICROBIOLÓGICOS REFERENTES AO EPISÓDIO ÍNDICE DE SEPSE	
4.1- Tipo de infecção: __ 1. Comunitária 2. Nosocomial	I__I
4.2- Sítio de infecção: __ 1.Pulmonar 2.Intra-abdominal 3.Renal 4.Cateter 5.Partes moles 6.Neurológico 7.Indeterminado 11.Misto	I__I__I
4.3- Tipo de pneumonia: __ 1.Comunitária 2.Nosocomial não VAP 3.Nosocomial VAP 9.NSA	I__I
4.4- Confirmação microbiológica da sepse: __ 0.Não 1.Sim	I__I
4.5- Hemocultura positiva: __ 0.Não 1.Sim	I__I
4.6 – Outra cultura positiva: __ 0. Não 1. Sim	I__I
4.7- Germe isolado como causa da sepse_1: __ __ __ (Tabela código)	I__I__I__I
4.8- Germe isolado como causa da sepse_2: __ __ __ (Tabela código)	I__I__I__I
5- VARIÁVEIS LABORATORIAIS À INCLUSÃO	
5.1- Hb: __ __, __g/L	I__I__I__I__I
5.2- Leucócitos totais: _____	I__I__I__I__I I__I__I__I
5.3- Neutrófilos: _____	I__I__I__I__I I__I__I__I
5.4- Bastonetes: _____ cls/mm ³	I__I__I__I__I I__I__I
5.5- Eosinófilos: _____ cls/mm ³	I__I__I__I__I I__I__I
5.6- Plaquetas: _____ cls/mm ³	I__I__I__I__I I__I__I
5.7- Lactato: __ __, __ mmol/L	I__I__I__I__I

5.8- PCR: ___ ___ mg/dL	I _ I _ I _ I
5.9 Ureia: ___ ___	I _ I _ I _ I
5.10- Creatinina: ___ __, ___	I _ I _ I _ I
5.11- pH: ___ , ___	I _ I, I _ I
5.12- RNI: ___ __ , ___	I _ I _ I, I _ I
5.13-PTTa: ___ . ___ vezes o controle	I _ I _ I _ I
5.14 – AST: _____	I _ I _ I _ I
5.15 – ALT:	I _ I _ I _ I
5.16 – IL-3: ___ __ , ___	I _ I _ I, I _ I
6- INTERVENÇÕES TERAPÊUTICAS PRIMEIRAS 72h INCLUSÃO	
6.1-Uso de corticoide durante as primeiras 72h de inclusão: ___ <i>0. não 1.sim</i>	I _ I
6.2- Corticoide usado para choque séptico: ___ <i>0. não 1.sim 9.NSA</i>	I _ I
6.3 Uso de ventilação mecânica durante as primeiras 72h: ___ <i>0. não 1.sim</i>	I _ I
6.4- Tipo de ventilação mecânica: ___ <i>0. invasiva 1. não invasiva 9. NSA</i>	I _ I
6.5- Uso de aminas vasopressoras nas primeiras 72h: ___ <i>0. não 1.sim</i>	I _ I
6.6- Uso de inotrópicos positivos nas primeiras 72h: ___ <i>0. não 1.sim</i>	I _ I
6.6- Submetido a hemodiálise nas primeiras 72h: ___ <i>0. não 1.sim</i>	I _ I
7- SEGUIMENTO 3º. DIA INCLUSÃO DATA: I _ _ I _	
_ I _ _ I	
7.1- PCR: _____	I _ I _ I _ I
7.2 – IL-3: ___ __ , ___	I _ I _ I, I _ I
7.3 - Lactato: ___ __, ___	I _ I _ I, I _ I
7.4 - Plaquetas: ___ __ ___	I _ I _ I _ I . I _ II _ I I _ I
7.5 – Global de leucócitos: ___ __ ___ __	I _ I _ I _ I _
7.6- SOFA total: ___ __	I _ I _ I
7.7 – Resolução da febre: ___	I _ I

<i>0. não 1.sim</i>	
10.6- Submetido à hemodiálise durante o seguimento: __ <i>0. não 1.sim</i>	I__I
11- DADOS 90º. DIA INCLUSÃO __I__I	DATA: I__I__
11.1- Condição alta CTI: __ <i>0. óbito 1. Sobrevivente</i>	I__I
11.2- Condição alta HC (caso tenha recebido alta): __ <i>0. óbito 1. sobrevivente</i>	I__I
11.3- Condição no 90º. dia incluso: __ <i>0. óbito 1. Sobrevivente</i>	I__I
11.4 Se óbito, data: __/__/__	I__I__ __I__I
12- DADOS 1 ANO INCLUSÃO __I__I	DATA: I__I__
12.1- Condição 1 ANO: __ <i>0. óbito 1. Sobrevivente</i>	I__I