UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ALINE GOZZI

Avaliação longitudinal de fatores inflamatórios e
linfócitos T reguladores em pacientes sépticos

Ribeirão Preto

2018

ALINE GOZZI

Avaliação longitudinal de fatores inflamatórios e
linfócitos T reguladores em pacientes sépticos

Versão original

Tese apresentada à
Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo
para obtenção do título de
Doutora em Ciências.

Área de Concentração:
Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Marcos
de Carvalho Borges

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Gozzi, Aline

Avaliação longitudinal de fatores inflamatórios e linfócitos T reguladores em pacientes sépticos. Ribeirão Preto, 2018.

95 f.: il.

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Marcos de Carvalho Borges

Versão original

1. Sepses. 2. Linfócitos T reguladores 3. Citocinas inflamatórias

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALINE GOZZI

Avaliação longitudinal de fatores inflamatórios e linfócitos T reguladores em pacientes sépticos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutora
em Ciências
Área de Concentração: Clínica Médica

Aprovado em _____/_____/_____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por me ter me concedido forças para chegar ao fim desse trabalho, e ter me iluminado na execução das tarefas desse projeto. Sei que não recebemos um fardo maior do que podemos suportar, e o Senhor esteve ao meu lado, me carregando nos braços quando não podia andar sozinha.

Agradeço especialmente à minha mãe e a meu pai, Nelci dos Anjos e José Carlos Gozzi, que acreditaram no meu potencial e sempre me apoiaram incondicionalmente. Obrigada pelo amor e carinho que vocês me dedicam em tempo integral, espero um dia poder retribuir da maneira como vocês merecem.

Ao meu orientador, professor Marcos de Carvalho Borges, por ter entrado comigo nessa jornada, e ter sido um sábio conselheiro e amigo durante todas as fases desse trabalho, auxiliando a contornar os obstáculos que surgiram durante esse período. Obrigada por acreditar em mim, e sobretudo por acreditar que eu poderia dar prosseguimento a este trabalho, idealizado por nosso querido e inesquecível Edwards Danni Damas da Silveira.

Ao meu parceiro de toda a vida, André Riul, pela paciência e compreensão, e também pela amizade e amor. Obrigada pelo apoio na etapa mais difícil do doutorado para mim, e por estar sempre me incentivando a chegar ao final. Agradeço especialmente à minha família postíça, minha sogra Maria José e meu sogro Ricardo, que me acolheram com tanto carinho em sua casa durante a parte experimental do projeto e me deram condições de seguir nessa jornada.

Aos dois anjos da guarda que se esforçaram imensamente para me ajudar em diversas situações. Gostaria de prestar um agradecimento especial à minha amiga Sandy, que não só me auxiliou na prática dos experimentos como resolveu todas os “pepinos” que eu não podia solucionar à distância. Além disso, ela faz um sanduíche de peito de peru incrível que nos deixa mais motivados a trabalhar nos fins de semana! E também a meu amigo *Jesuis*, vulgo Daniel, que foi o pilar da parte clínica deste projeto, e deu literalmente seu sangue para me ajudar, mesmo quando estava atolado de trabalho. Graças a sua forma agradável de tratar todos, incluindo os pacientes, nosso trabalho ficou completo.

Ao laboratório dos professores Zeca e Fernando, e aos colegas David e Fernanda, que auxiliaram quando e como eu não podia na execução desse projeto. Sem essa ajuda seria muito difícil completar a tarefa. Agradeço também à Giu, que com toda sua personalidade amável foi essencial para a realização das análises de ELISA.

Aos queridos Rodrigo e Tânia, cuja contribuição foi inestimável para execução desse projeto e à toda equipe da Unidade de Emergência do HC, que contribuiu para a correta inclusão de pacientes e consecução do trabalho, além do aluno de iniciação científica Leandro, que compilou os dados clínicos e foi fundamental no início da pesquisa. Agradeço também à Unidade de Pesquisa Clínica do HC-Campus, que recebeu os pacientes no retorno para coleta de sangue e entrevista.

Ao meu grande amigo Tiago, obrigada pelo apoio incondicional e carinho desde 2012. Nossa amizade tem sido fundamental para minha vida dentro e fora do ambiente acadêmico. Também às minhas amigas chibatinhas Nayara e Taline, que a distância tem sido tão cruel nos permitindo encontrar tão pouco ultimamente.

Aos meus companheiros de laboratório, sobretudo as “old school”, com quem posso contar até hoje, Ana Paula, Camila, Thamires e Vanessa, que compartilharam momentos inesquecíveis de amizade e conhecimento. Mesmo que não tenhamos mais nos encontrado toda terça-feira para falar de PCR, permanecemos unidas na busca do presente perfeito de fim de ano (cerveja) para nosso querido mestre.

Aos meus companheiros de trabalho do Ministério da Agricultura, em Pedro Leopoldo, que além de me acolherem com toda a hospitalidade mineira, me apoiaram para finalizar o doutorado, que foi feito quase que integralmente após a minha mudança. Foram pouco mais de três anos de malabarismo entre trabalho e estudo, mas meus queridos chefes Nilson e Valéria foram muito compreensivos em todos os momentos de ausência.

Às minhas amigas, Raquel, Taila, Marcela e Tailany, e demais coleguinhas do LANAGRO, que estão esperando ansiosamente para que eu tenha fins de semana livres do doutorado para finalmente possuir uma vida social normal.

Aos pacientes e voluntários desse estudo, que concordaram em participar e auxiliar, de alguma maneira, na consecução e obtenção de resultados e conclusões dessa obra.

“Ama-se mais o que se conquista com esforço.”

(Benjamin Disraeli)

RESUMO

GOZZI, A. **Avaliação longitudinal de fatores inflamatórios e linfócitos T reguladores em pacientes sépticos**. 2018. 95 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A sepse é descrita como uma disfunção orgânica ameaçadora à vida secundária à resposta desregulada do organismo a uma infecção, e é responsável por uma alta e crescente taxa de internação hospitalar no Brasil e no mundo. Apesar da diminuição da mortalidade ao longo do tempo, efeitos da doença a longo prazo como infecções secundárias e mortes tardias têm sido observadas. A sepse caracteriza-se pela liberação de mediadores inflamatórios e posterior imunossupressão compensatória, e o distúrbio na homeostase pode causar danos às células e órgãos levando a um estado mais grave da doença. Os linfócitos T reguladores (Tregs) são células responsáveis pela tolerância periférica e modulação de processos inflamatórios e são essenciais na imunossupressão observada na sepse. Este trabalho teve por objetivo estudar a relação entre a atividade imunológica (quantificação de Tregs, monócitos e citocinas inflamatórias) e a susceptibilidade a novas infecções e mortalidade em pacientes sépticos admitidos na Unidade de Emergência do HC-FMRP-USP. Foram incluídos 33 pacientes sépticos e 34 controles saudáveis, entre outubro de 2014 e novembro de 2015. Os pacientes foram acompanhados durante a internação na admissão (D0), D2, D7, D14, D21 e D28, e 12 pacientes retornaram para avaliação pelo menos três meses após a alta. Os pacientes tiveram porcentagens de Treg em linfócitos CD4+ elevados em relação aos controles nos momentos D2 e retorno ($p = 0,0004$), sendo que no D2 pacientes que desenvolveram complicação infecciosa tiveram porcentagens significativamente menores que os que não desenvolveram complicação ($p = 0,0015$). Além disso, porcentagens altas de Treg na admissão (D0) correlacionaram-se inversamente com o tempo de internação dos pacientes sobreviventes ($p = 0,0271$). Valores absolutos de Treg nos pacientes estiveram significativamente elevados no retorno em relação à admissão ($p = 0,0074$). Pacientes no retorno tiveram maior porcentagem de monócitos CD163+ em relação aos controles ($p = 0,036$). Pacientes na admissão tiveram menor porcentagem de

monócitos HLA-DR+ em relação aos controles e aos pacientes no retorno ($p = 0,0057$). Pacientes tiveram valores de IL-6, IL-8, IL-10 e ST2 superiores em relação aos controles em diversos momentos da internação e retorno ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p = 0,0030$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Valores de ST2 na admissão correlacionaram-se com o escore SOFA ($p = 0,0252$), tempo de internação ($p = 0,0105$), presença de complicação infecciosa ($p = 0,0356$) e mortalidade ($p = 0,0114$) dos pacientes. Valores de IL-8 na admissão também se correlacionaram com a presença de complicação infecciosa ($p = 0,0387$). Podemos inferir, portanto, que apesar de uma inflamação exacerbada já na admissão dos pacientes, evidenciada por altos valores de citocinas inflamatórias, há um aumento posterior de células Treg, imunorreguladoras, no D2, e o mesmo foi benéfico em relação à recuperação mais rápida dos pacientes e instalação de uma nova infecção. Porém, a imunossupressão continua sendo exibida mesmo após a alta dos pacientes, como podemos observar com a alta porcentagem de Tregs e monócitos CD163+ e valores de IL-10 nos pacientes em retorno em relação aos controles. Além disso, muitos dos pacientes sobreviventes à primeira internação foram internados novamente, e alguns deles foram a óbito no ano seguinte.

Palavras-chave: Sepses. Linfócitos T reguladores. Citocinas inflamatórias.

ABSTRACT

GOZZI, A. **Longitudinal evaluation of inflammatory factors and regulatory T lymphocytes in septic patients.** 2018. 95 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Sepsis is defined by a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection, and it is responsible for a high and increasing rate of hospital admission in Brazil and worldwide. Despite the decrease in mortality over time, long-term disease effects such as secondary infections and late deaths have been observed. Sepsis is characterized by the release of inflammatory mediators and subsequent compensatory immunosuppression, and the homeostasis disorder can cause damage to cells and organs leading to a more severe disease state. Regulatory T lymphocytes (Tregs) are cells responsible for peripheral tolerance and modulation of inflammatory processes and are essential in the immunosuppression observed in sepsis. This study aimed to investigate the relationship between immunological activity (quantification of Tregs, monocytes and inflammatory cytokines) and susceptibility to new infections and mortality in septic patients admitted to the HC-FMRP-USP Emergency Unit. Thirty-three septic patients and 34 healthy controls were included between October 2014 and November 2015. Patients were followed up at admission (D0) and during hospitalization at D2, D7, D14, D21 and D28, and 12 patients returned for evaluation at least three months after discharge. Patients had higher Treg percentages on CD4 + lymphocytes than had controls at D2 and on return ($p = 0.0004$), whereas in D2 patients who developed infectious complications had significantly lower percentages than those who did not develop complications ($p = 0.0015$). In addition, high percentages of Treg at admission (D0) correlated inversely with the length of hospital stay of surviving patients ($p = 0.0271$). Absolute values of Treg in patients were significantly elevated in the return relative to admission ($p = 0.0074$). Patients on return had a higher percentage of CD163 + monocytes than controls ($p = 0.036$). Patients on admission had a lower percentage of HLA-DR+ monocytes than controls and patients on return ($p = 0.0057$). Patients had higher IL-6, IL-8, IL-10 and ST2 levels than controls at various times of

hospitalization and return ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p = 0.0030$ and $p < 0.0001$, respectively). ST2 values at admission were correlated with SOFA score ($p = 0.0252$), length of hospital stay ($p = 0.0105$), presence of infectious complication ($p = 0.0356$) and mortality ($p = 0.0114$). IL-8 values at admission also correlated with the presence of infectious complication ($p = 0.0387$). We can infer, therefore, that despite exacerbated inflammation as soon as at the admission of the patients, demonstrated by high levels of inflammatory cytokines, there is a posterior increase of immunoregulatory Treg cells at D2, and that was beneficial in relation to the faster recovery of the patients and setting up of new infection. However, immunosuppression continues to appear even after discharge of patients, as can be observed with the high percentage of CD163 + monocytes, Tregs and L-10 levels in patients on return compared to controls. In addition, many of the patients surviving the first hospitalization were hospitalized again, and some of them died the following year.

Keywords: Sepsis. Regulatory T lymphocytes. Inflammatory cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mortalidade da sepse no Brasil de acordo com o ano por sepse e choque séptico - comparação entre os dados de hospitais públicos e hospitais privados.	20
Figura 2. Fisiopatologia da sepse no envolvimento das células da imunidade inata quando do reconhecimento de patógenos.	22
Figura 3. Efeitos da imunossupressão tardia da sepse.	25
Figura 4. Representação esquemática do papel imunossupressor das células T reguladoras naturais ou induzidas pela presença de IL-10 ou TGF- β	26
Figura 5. Gráfico mostrando a evolução da mortalidade em pacientes sépticos ao longo do tempo.	30
Figura 6. Fluxo da inclusão dos pacientes no estudo.	43
Figura 7. Número de amostras analisadas para cada parâmetro do estudo e em cada momento de coleta.	44
Figura 8. Valores para o escore SOFA na admissão para os pacientes com sepse grave e choque séptico.	46
Figura 9. Valores para o escore APACHE II para os pacientes com sepse grave e choque séptico.	46
Figura 10. Valores para o escore SAPS III para os pacientes com sepse grave e choque séptico.	47
Figura 11. Idade e índice de comorbidades de Charlson dos pacientes que tiveram alta hospitalar e que foram a óbito.	47
Figura 12. Valores do escore SOFA nos momentos D0, D2, D7 e D14 para os pacientes que tiveram alta hospitalar e os que foram a óbito.	48
Figura 13. Valores dos escores APACHE II e SAPS III para os pacientes que tiveram alta hospitalar e os que foram a óbito.	48
Figura 14. Tempo de internação e escore SOFA no D2, D7 e D14 entre os pacientes que tiveram complicação infecciosa no decorrer da internação e os que não tiveram.	49
Figura 15. Separação dos linfócitos na população total de PBMC de paciente. Os linfócitos são determinados por seu tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) característicos.	51
Figura 16. Determinação dos linfócitos CD4 ⁺ através da plotagem SSC-A x FITC-A:CD4 da população de linfócitos definida previamente.	51

Figura 17. Quantificação de Tregs exibindo no quadrante 2 sua respectiva porcentagem para cada uma das amostras, sendo estas os controles de marcação (A: linfócitos CD4+ do controle sem marcação para FoxP3 e B: linfócitos do controle marcadas apenas com foxp3 e C: linfócitos CD4+ do controle) e D: linfócitos CD4+ de paciente.	52
Figura 18. Representação gráfica da porcentagem de linfócitos Tregs em diversos grupos (controle e pacientes), com análise de variância entre eles.	54
Figura 19. Porcentagem de Tregs em linfócitos CD4+ dos pacientes ao longo do tempo de internação e retorno, comparados ao grupo controle. Foram utilizados a média e o erro padrão da média, para cada grupo representado na linha do tempo.	54
Figura 20. Valores de Treg (%) em todos os momentos de coleta para pacientes que tiveram ou não complicação infecciosa no decorrer da internação.	55
Figura 21. Porcentagens de Treg durante a internação para os grupos de pacientes que foram a óbito e sobreviventes.	56
Figura 22. Interpolação gráfica entre a porcentagem de Tregs na admissão dos pacientes sobreviventes com seu tempo de internação.	56
Figura 23. Representação gráfica da quantidade de células Tregs por mL de sangue total para cada grupo estudado.....	57
Figura 24. Variação da quantidade de diversos tipos celulares no sangue total para cada grupo estudado.	58
Figura 25. Correlação de Tregs e SOFA em diversos momentos da internação.	58
Figura 26. Seleção da população de interesse para análise de monócitos (CD14+). .	59
Figura 27. Ilustração da determinação da porcentagem de células positivas para CD163 do paciente 19 no retorno e seu respectivo controle.	60
Figura 28. Ilustração da determinação da porcentagem de células positivas para CD206 do paciente 24 no retorno e seu respectivo controle.	61
Figura 29. Ilustração da determinação da porcentagem de células positivas para HLA-DR do paciente 30 na admissão e seu respectivo controle.....	61
Figura 30. Porcentagem de células positivas para a molécula CD163 nos monócitos CD14+ de indivíduos controles e pacientes sépticos na admissão e retorno.	62
Figura 31. Porcentagem de células positivas para CD206 nos monócitos CD14+ do grupo controle e grupo de pacientes na admissão e retorno.....	63
Figura 32. Porcentagem de células positivas para a molécula HLA-DR nos monócitos CD14+ de indivíduos controles e pacientes sépticos durante a internação e após a alta hospitalar.	63

Figura 33. Valores das citocinas IL-6, IL-8, IL-10 e ST2 em pg/ml para cada grupo avaliado e a diferença entre eles.	65
Figura 34. Valores das citocinas IL-4, IL-33, TNF- α e TGF- β em pg/ml para cada grupo avaliado.	65
Figura 35. Correlação entre os valores do escore SOFA e a citocina ST2 na admissão dos pacientes e correlação entre o tempo de internação dos pacientes e os valores da citocina ST2 na admissão.	66
Figura 36. Valores da citocina ST2 para os grupos de pacientes que vieram a óbito e que sobreviveram à sepse.	67
Figura 37. Correlação entre os valores obtidos para as citocinas IL-33 e ST2 na admissão dos pacientes.	67
Figura 38. Evolução durante o tempo de internação e retorno das citocinas em pacientes que tiveram ou não complicação infecciosa.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios para pontuação do escore SOFA.	17
Tabela 2: Relação Instrumentos de medição em cada dia de coleta (Eventos) no software RedCapTM.	36
Tabela 3. Dados clínicos reportados em cada instrumento de medição criado no software RedCapTM.	36
Tabela 4. Características demográficas e clínicas dos pacientes com sepse.	44
Tabela 5. Desfechos observados no acompanhamento após a alta hospitalar.	50
Tabela 6. Características clínicas e demográficas dos controles.	50
Tabela 7. Porcentagem de linfócitos T reguladores em linfócitos CD4+ para cada grupo estudado.	53
Tabela 8. Porcentagem de células positivas em monócitos CD14+, para os parâmetros analisados.	62
Tabela 9. Mediana e intervalo interquartil dos valores das citocinas analisadas para cada grupo de pacientes e controles.	64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Sepses – Definições	16
1.2 Epidemiologia da sepses	18
1.3 Fisiopatologia da sepses	21
1.4 Imunossupressão na sepses	24
1.5 Linfócitos T reguladores	25
1.6 Tregs em sepses	27
1.7 Monócitos em sepses	28
1.8 Citocinas em sepses	28
1.9 Hipótese do estudo.....	30
2. OBJETIVOS	33
2.1 Geral	33
2.2 Específicos	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Participantes do estudo	34
3.2 Pacientes com sepses	34
3.2.1 Critérios de inclusão	34
3.2.2 Critérios de não-inclusão	35
3.2.3 Critérios de exclusão	35
3.3 Acompanhamento clínico dos pacientes	35
3.4 Dias de coleta	36
3.5 Controles	37
3.6 Coleta do material e análises realizadas	37
3.7 Análise de monócitos.....	37
3.8 Processamento das amostras de sangue total e obtenção de PBMC	38
3.9 Análise de linfócitos T reguladores (Tregs)	39
3.10 Valores absolutos de linfócitos Tregs	40
3.11 Avaliação da atividade inflamatória e anti-inflamatória.....	41
3.12 Análise estatística dos dados	41
3.13 Aspectos éticos.....	41

4. RESULTADOS	43
4.1 Inclusão dos pacientes	43
4.2 Resumo das coletas realizadas.....	43
4.3 Características demográficas, clínicas e laboratoriais da população do estudo	44
4.4 Acompanhamento pacientes que tiveram alta hospitalar.....	50
4.5 Controles	50
4.6 Quantificação de linfócitos T reguladores	51
<i>4.6.1 Porcentagens de Treg no segundo dia de internação correlacionam-se com instalação de complicação infecciosa.....</i>	<i>55</i>
<i>4.6.2 Porcentagens de Treg durante a internação não se correlacionam com a mortalidade</i>	<i>56</i>
<i>4.6.3 Pacientes com maiores porcentagens de Treg na admissão ficam menos tempo internados</i>	<i>56</i>
<i>4.6.4 Número absoluto de linfócitos Treg.....</i>	<i>57</i>
<i>4.6.5 Correlação entre o número absoluto de Tregs e o valor do escore SOFA..</i>	<i>58</i>
4.7 Monócitos.....	59
4.8 Citocinas.....	64
<i>4.8.1 Valores das citocinas nos pacientes com complicação infecciosa</i>	<i>68</i>
5. DISCUSSÃO.....	70
5.1 Inclusão e dados clínicos dos pacientes	70
5.2 Complicações infecciosas durante a internação.....	72
5.3 Acompanhamento dos pacientes com alta hospitalar	73
5.4 Linfócitos T reguladores	73
5.5 Monócitos.....	76
5.6 Citocinas.....	77
5.7 Considerações finais	80
5.8 Limitações do estudo	82
6. CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS	85
APÊNDICE A - SOLUÇÕES PREPARADAS.....	93
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	94

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sepses – Definições

A palavra *sepsis* se origina da língua grega e significa “decompor matéria orgânica animal ou vegetal na presença de bactéria”. O termo apareceu pela primeira vez nos poemas de Homero como derivação do verbo grego *sepo*, que significa apodrecer (1). De fato, por muitos anos acreditava-se ser essa uma doença onde o corpo sofria as ações de uma infecção, resultando em um estado de decomposição de tecidos (2). Apenas recentemente sua etiofisiopatologia foi melhor estudada, sabendo-se hoje que se trata de uma resposta inflamatória do corpo frente à invasão de microrganismos (2, 3).

As definições e terminologias da sepsis foram padronizadas pela primeira vez em 1991, em uma conferência realizada em Chicago com a participação das entidades *American College of Chest Physicians* (ACCP) e *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) (2, 4-6). Foram introduzidos dois novos termos: síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (MODS). Além disso, foram discriminados termos que caracterizam a gravidade da doença, como sepsis, sepsis grave e choque séptico (2, 4-6).

Dessa forma, toda resposta inflamatória generalizada passou a ser denominada de SIRS se atendesse a pelo menos dois dos seguintes critérios: temperatura corporal maior que 38°C ou menor que 36°C; frequência cardíaca maior que 90 batimentos por minuto; contagem de leucócitos anormal (maior que 12 mil células por mm³, menor que 4 mil células por mm³, ou mais de 10% de bastonetes); e taquipneia (frequência respiratória maior que 20 inspirações por minuto ou PaCO₂ menor que 32 mmHg).

Adicionalmente, se a SIRS fosse secundária a infecção, e não decorrente de outros fatores responsáveis por inflamação como trauma, queimadura e pancreatite, estabelecia-se o diagnóstico de sepsis (4, 5, 7). Atualmente, sabe-se que tanto bactérias, como fungos, vírus e parasitas podem acionar a liberação de mediadores inflamatórios e causar sepsis (5).

A diferenciação da sepse em seus vários graus de gravidade também foi introduzida na conferência de 1991, com os termos “sepse”, “sepse grave” e “choque séptico”. Sepse grave foi então definida como sepse associada a disfunção de órgãos, hipoperfusão tecidual, ou hipotensão; e choque séptico como a persistência da hipotensão, mesmo após terapia adequada de reposição de fluidos (5).

Em 2001 novos conceitos foram introduzidos para critérios diagnósticos da sepse na ocasião da segunda conferência internacional entre sociedades e organizações de saúde, com a adição de novos sinais e sintomas, porém as definições permaneceram as mesmas estabelecidas em 1991 (8).

Mudanças mais significativas surgiram somente em 2016, na terceira conferência internacional para definições da sepse e sepse choque. Nela, o conceito de sepse grave foi abolido, o critério diagnóstico para estabelecimento da sepse foi alterado, e uma nova ferramenta foi introduzida, denominado quick-SOFA (qSOFA) (9).

Sepse foi definida então como uma disfunção orgânica ameaçadora à vida secundária à resposta desregulada do organismo a uma infecção. Choque séptico foi definido como subgrupo da sepse cujas acentuadas anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas podem aumentar o risco de morte (9).

Na prática, o diagnóstico de sepse se estabelece em pacientes com suspeita de infecção e uma elevação de dois ou mais pontos no escore SOFA (*Sequential organ failure Assessment*), cuja pontuação está resumida na Tabela 1. O SOFA leva em consideração o acometimento de órgãos dos sistemas respiratório, hepático, cardiovascular, nervoso central e renal, além da coagulação. O paciente deve ser considerado com uma pontuação basal de zero, a menos que exista alguma condição comprometedora a órgãos conhecida previamente (10).

Tabela 1. Critérios para pontuação do escore SOFA.

Sistemas	Parâmetros	Pontuação				
		0	1	2	3	4
Respiratório	PaO ₂ /FIO ₂ mmHg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7)	<100 (13.3)
					com suporte respiratório	com suporte respiratório
Coagulação	Plaquetas ×10 ³ /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Hepático	Bilirrubina mg/dL (μmol/L)		1.2–1.9 (20–32)	2.0–5.9 (33–101)	6.0–11.9 (102–204)	>12.0 (204)

Sistemas	Parâmetros	Pontuação				
		0	1	2	3	4
Cardiovascular	-	<1.2 (20)				
	-	MAP ≥70 mmHg	MAP <70 mmHg	Dopamina <5 ou dobutamina (qualquer dose)	Dopamina 5.1–15 ou epinefrina ≤0.1 ou norepinefrina ≤0.1	Dopamina >15 ou epinefrina >0.1 ou norepinefrina >0.1
SNC	Escala de coma Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal	Creatinina mg/dL (μmol/L)	<1.2 (110)	1.2–1.9 (110–170)	2.0–3.4 (171–299)	3.5–4.9 (300–440)	>5.0 (440)
	Produção de urina mL/dia				<500	<200

FIO₂: fração de oxigênio inspirado; MAP: pressão arterial média; PaO₂: pressão parcial de oxigênio.

Já para o diagnóstico de choque séptico, o paciente com sepse deve ter hipotensão persistente com necessidade de uso vasopressores para manutenção da pressão arterial média ≥ 65 mmHg, além de concentração de lactato sérico > 2 mmol/L (18 mg/dL), apesar de adequada infusão de fluidos (9).

Adicionalmente, como para cálculo do SOFA é necessário a realização de testes laboratoriais, a força tarefa reunida na terceira conferência estabeleceu um instrumento para avaliação inicial, que pode ser feita à beira do leito, rapidamente. O qSOFA leva em consideração a frequência respiratória (≥ 22 respirações por minuto), a presença de cognição alterada (escala de coma Glasgow inferior a 15) e a pressão sanguínea sistólica (≤ 100 mmHg). Com dois ou três desses requisitos, o paciente deve ser considerado com maior probabilidade de desfechos clínicos desfavoráveis na presença de uma infecção (9). Assim, o qSOFA é um instrumento de triagem e não de diagnóstico de sepse.

1.2 Epidemiologia da sepse

Devido ao melhor conhecimento da sepse, maior número de estudos epidemiológicos e mudanças no perfil demográfico da população, houve um aumento na incidência da sepse nos últimos anos. Um grande estudo epidemiológico realizado em 2003 mostrou que entre 1979 e 2000 houve um aumento anual de 8,7% na

incidência da sepse nos EUA, passando de cerca de 164 mil casos em 1979 para aproximadamente 660 mil em 2000 (11). Outro estudo, conduzido por Dombrovskiy *et al.*, analisou todos os pacientes com sepse hospitalizados nos EUA entre 1993 e 2003 e demonstrou um aumento na incidência ajustada de sepse de $66,8 \pm 0,16$ para $132 \pm 0,21$ por 100 mil habitantes ($p < 0,001$) (12). Mais recentemente, Adhikari *et al.* estimaram uma incidência de aproximadamente 19 milhões de casos de sepse no mundo por ano (13).

Dentre os grupos mais propensos à aquisição da sepse grave estão os idosos, homens, negros e pessoas com doenças crônicas (14), sendo que a propensão maior na população negra deve-se a uma maior taxa de infecção e maior risco de disfunção aguda de órgãos nessa população (14, 15).

Um estudo recente publicado por Rhee *et al.* mostra que a incidência da sepse é muito maior quando observados os critérios clínicos definidos na terceira conferência internacional de consenso do que se contabilizados apenas os casos declarados. Eles observaram uma incidência de 6,0% de sepse dentre pacientes hospitalizados em 409 hospitais dos EUA em 2014, sendo que 15,0% morreram durante a internação. Eles relataram ainda que a sepse esteve presente em 35% das internações que resultaram em mortes (16).

Um dos primeiros estudos multicêntricos de epidemiologia da sepse no Brasil é o BASES (Estudo epidemiológico brasileiro de sepse), publicado em 2004 e conduzido em cinco hospitais nos estados de São Paulo e Santa Catarina. A incidência de sepse foi de 30,5 casos por 100 admissões nas UTIs. Dos pacientes que tiveram tempo de estadia maior do que 24h, 46,9% se encaixavam nos critérios de sepse e, entre eles, a mortalidade foi 33,9% (17). Já em 2017, o SPREAD (Sepsis prevalence assessment database), estudo conduzido em todas as regiões do Brasil em uma única data de inclusão (27/02/2014), revelou um número muito semelhante (30,2 pacientes sépticos a cada 100 leitos de UTIs), sendo a incidência da sepse 36,3 por 1000 pacientes-dia. A incidência estendida para a população foi calculada como 290 casos em 100.000 habitantes, o que gera cerca de 420.000 casos de sepse no país por ano (18).

Além da significativa incidência, outra preocupação relacionada à sepse é a alta mortalidade dos pacientes acometidos. Apesar de a taxa de letalidade da doença

estar diminuindo com o tempo, como relatado na metanálise publicada por Fleischmann e colaboradores em 2016 (19), e em um estudo sobre a epidemiologia da sepse na Austrália e Nova Zelândia na última década (20), o número de mortes de pacientes acometidos com essa síndrome ainda é alarmante. A sepse grave é a principal causa de morte dentro de hospitais nos EUA (21). Em um estudo que utilizou dados de hospitais inscritos na *Surviving Sepsis Campaign*, foi demonstrado que a mortalidade hospitalar de pacientes com sepse variou de 28,3 a 41,1% nos EUA e Europa, respectivamente (22). De acordo com o estudo SOAP, realizado em 24 países da Europa, 37,4% dos pacientes em UTIs apresentaram sepse durante sua estadia, com uma taxa de mortalidade de 32,2% para os pacientes com sepse grave e 54,1% para choque séptico (23).

No Brasil, a mortalidade é ainda maior, como evidenciado no estudo PROGRESS, publicado em 2009, que avaliou a mortalidade em diferentes UTIs. Nele, o Brasil se encontra entre os países com maior mortalidade em sepse grave entre 37 países estudados como Alemanha, Argentina, Canadá, Índia, EUA, Malásia, Austrália, entre outros. A mortalidade em nosso país foi 67,4%, mais que o dobro da taxa na Austrália (32,6%), e bem maior que outros países em desenvolvimento, como os 39% na Índia, por exemplo (24).

O Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS) promove o programa *quality improvement*, com participação de mais de 130 instituições brasileiras que alimentam um banco de dados de pacientes com sepse e choque séptico (25). O relatório publicado em 2017, com dados de 2005 a 2016, nos mostra uma diminuição da mortalidade dos pacientes sépticos ao longo dos anos, com notáveis diferenças entre instituições públicas e privadas, conforme observamos na Figura 1.

Figura 1. Mortalidade da sepse no Brasil de acordo com o ano por sepse e choque séptico - comparação entre os dados de hospitais públicos e hospitais privados.

Fonte: ILAS, Relatório Nacional – Protocolos Gerenciados de Sepse (2017) (25).

Mesmo que a taxa de mortalidade de pacientes com sepse no Brasil esteja reduzindo com o tempo, ela ainda continua alta, principalmente quando comparada com países desenvolvidos, como EUA e Austrália. Além disso, considerando o aumento na incidência de sepse, o número absoluto de pacientes que morrem por causa dessa doença pode ser ainda maior que anteriormente.

1.3 Fisiopatologia da sepse

Para explicar a fisiopatologia da sepse, inicialmente foi proposto a presença de uma resposta inflamatória exuberante. Posteriormente, Bone *et al.* sugeriram também a presença de uma resposta anti-inflamatória compensatória em resposta à atividade inflamatória inicial que pode contrapor à inflamação exacerbada restaurando a homeostase, ou mesmo se sobrepor a ela, causando um estado de imunoparalisia que leva o organismo a dificuldades na eliminação de patógenos (26).

Primariamente, o sistema imune inato reconhece substâncias nocivas como o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas, o ácido lipoteicóico (LPA) de bactérias Gram-positivas, superantígenos como as toxinas de *S. aureus* e *S. pyogenes*, entre outros PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) e DAMPs (padrões moleculares associados a danos) (2). Esses padrões são reconhecidos pelo complemento e por células imunes, epiteliais e endoteliais que possuem receptores

de reconhecimento de padrões, como *TLRs* (*Toll-like receptors*), receptores de lecitina tipo-C, receptores *RIG-like* (*retinoic acid-inducible gene*) e receptores *NOD-like* (*nucleotide-binding oligomerization domain*) (27-29). Alguns desses receptores, principalmente os intracelulares *NOD-like*, formam um complexo molecular denominado inflamassoma, responsável pela maturação e secreção de IL-1 β e IL-18, além de desencadear morte celular programada por ruptura da membrana plasmática mediada por caspase (30).

As interações com os receptores e co-receptores das células da imunidade inata levam à expressão de genes ligados à inflamação, ao metabolismo celular e à imunidade adaptativa. O caminho celular para ativação desses genes utiliza substâncias intermediárias que levam à fosforilação de MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), JAKs (*janus kinases*) e ativação da transcrição com STATs (*signal transducers and activators of transcription*) e NF- κ B (*nuclear factor κ B*) (27).

A estimulação da transcrição dos genes de ativação rápida leva à liberação de mediadores da inflamação, como citocinas e quimiocinas. As citocinas pró-inflamatórias liberadas ativam mais células da imunidade inata, intensificam a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas por células endoteliais, induzem neutrófilos a liberar sua rede extracelular (NETs) e aumentam a expressão do fator tecidual de monócitos, contribuindo para a formação de trombos que servem de “armadilhas” para os microrganismos circulantes no sangue (29, 30). Todo esse processo tem um efeito substancial na coagulação e no endotélio vascular e linfático, com aumento na expressão de selectinas e moléculas de adesão, aumentando a coagulação e permeabilidade vascular (27, 29).

Um resumo dos acontecimentos mediados pela imunidade inata no acometimento da sepse está ilustrado na Figura 2.

Figura 2. Fisiopatologia da sepse no envolvimento das células da imunidade inata quando do reconhecimento de patógenos.

Fonte: Gotts e Matthay (2016) (30).

Quando a resposta inflamatória inicial ultrapassa um determinado limiar, ocorre um prejuízo sistêmico gerado pelo acentuado dano a moléculas e organelas celulares por espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico; coagulação vascular disseminada pelo excesso de fatores de coagulação e falhas no sistema anticoagulante; diminuição da perfusão tecidual pelo dano à mitocôndria e pelo extravasamento de fluidos nos espaços extravasculares, consequente da permeabilidade vascular exagerada; e rompimento de barreiras celulares de vários órgãos contribuindo para o estabelecimento das disfunções orgânicas presentes nos casos mais graves de sepse (27, 30).

A resposta específica de cada organismo depende do tipo de patógeno causador da infecção e das características do hospedeiro, como condições genéticas

e doenças pré-existentes. Porém, alguns sinais e sintomas são comumente observados durante o curso clínico da sepse, em vários órgãos e sistemas do organismo. No sistema respiratório, pode ocorrer a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA); hipotensão e lactato sérico elevado são sinais que ocorrem no sistema circulatório; o sistema nervoso central pode ser acometido com alterações mentais, como delírio; alterações no sistema renal manifestam-se como diminuição na produção de urina e aumento da creatinina sérica; além de outros sintomas como coagulação intravascular disseminada (CID), aumento de aminotransferases séricas, trombocitopenia, alteração na glicemia, entre outros (28).

1.4 Imunossupressão na sepse

Mudanças na imunidade adaptativa ao longo da trajetória da sepse demonstram predominância de um estado imunossupressivo. O sistema imunológico possui diversos mecanismos para atenuar os efeitos nocivos da resposta inflamatória exagerada, incluindo mecanismos neurais que inibem a inflamação pela liberação de norepinefrina no baço e acetilcolina, que utiliza receptores $\alpha 7$ colinérgicos em macrófagos para suprimir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (28, 29). As maiores observações contudo são a marcante apoptose nas populações de linfócitos T e B (31), alternância do fenótipo de fagócitos para reparação tecidual (28), diminuição na produção de citocinas inflamatórias por monócitos, fenótipo neutrofílico imaturo, e número elevado de células supressoras mielóides neutrófilo-like (MDSCs), que secretam citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β (27).

A apoptose impacta não somente pela diminuição de células imunes como também pelos efeitos da absorção das células apoptóticas por monócitos, macrófagos e células dendríticas, que resulta em imunotolerância, diminuindo o combate aos patógenos restantes (32).

Disfunções em células T incluem a ocorrência de um estado anérgico com diminuição da proliferação após estimulação mitôgenica, uma mudança para o padrão de secreção de citocinas Th2 e aumento da proporção de Tregs (33). A fagocitose de linfócitos apoptóticos também causa a liberação de citocinas anti-inflamatórias por macrófagos e células dendríticas. Além disso, células

apresentadoras de antígenos (APCs) perdem a expressão de HLA-DR, molécula MHC de classe II (27, 29).

Um resumo da fisiopatologia das respostas pró e anti-inflamatórias na sepse encontra-se ilustrado na Figura 3.

Figura 3. Efeitos da imunossupressão tardia da sepse.

Fonte: van der Poll *et al.* (2017) (29).

1.5 Linfócitos T reguladores

Caracterizados pela primeira vez em 1995, os linfócitos T reguladores, também chamados de Tregs, são um grupo de linfócitos T CD4⁺ responsáveis pela manutenção da tolerância periférica, atuando na modulação de processos inflamatórios agudos e crônicos (34). Apesar de representar uma pequena porção dos linfócitos T, as Tregs aparentemente apresentam uma função regulatória potente na ativação celular,

sendo por isso de papel fundamental na inibição da resposta imunológica, tanto adaptativa como inata (35, 36). Sua atuação está ligada a autoimunidade na rejeição de transplantes, respostas inflamatórias, desenvolvimento de tumores e alergias (37). Em pessoas saudáveis, as Tregs representam aproximadamente 6-8% do total de linfócitos T CD4+ (33).

Os possíveis mecanismos de ação das Tregs para imunossupressão incluem a morte celular direta de linfócitos T e células apresentadoras de antígeno (APCs) e a modulação da sinalização de células alvo, seja pela liberação de citocinas como IL-10, IL-35 e TGF- β , seja via contato celular direto ou ainda pela atuação de micro-RNAs (34, 37, 38).

Acredita-se que a função imunossupressora das Tregs se baseie na presença do fator de transcrição intracelular Foxp3 (*Forkhead-winged helix transcription factor p3*), cujo gene localiza-se no cromossomo X (38). A disfunção desse gene leva a uma série de doenças autoimunes como a síndrome IPEX (desregulação imune, poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao X) (39). A presença deste fator é essencial para manutenção das Tregs, uma vez que ele consegue controlar a expressão das moléculas necessárias para sua função e sobrevivência, como CD25 (receptor da IL-2) e CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*) (38).

Existem basicamente dois tipos de Tregs: as naturais (nTregs), provenientes do timo, caracterizadas pela presença de CD4, CD25 e Foxp3; e as induzidas ou adaptativas (iTregs), desenvolvidas pela diferenciação de células T *naive* periféricas com aquisição de CD25 e Foxp3 após estimulação dos receptores de células T (TCR) (40). As iTregs são induzidas nos tecidos linfóides pela ligação de antígenos e na presença de citocinas como IL-10, IL-6 e TGF- β e ausência de citocinas pró-inflamatórias (35, 36). Elas dependem de IL-2 para seu desenvolvimento e sobrevivência, e podem redirecionar a diferenciação de macrófagos para o fenótipo anti-inflamatório (M2) (34). Uma representação esquemática resumida da ação das Tregs encontra-se na Figura 4.

Figura 4. Representação esquemática do papel imunossupressor das células T reguladoras naturais ou induzidas pela presença de IL-10 ou TGF- β .

Fonte: Mills (2004) (41).

A identificação dos linfócitos T reguladores normalmente é realizada pela presença dos marcadores CD4, CD25, foxp3 e ausência de CD127. Outros marcadores de superfície também podem ser utilizados, como CTLA-4 e GITR (*glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein*) (34).

1.6 Tregs em sepse

Um dos mecanismos elencados para a imunossupressão na sepse é a presença de linfócitos T reguladores (32). Muitos estudos clínicos (42) e experimentais (35) demonstraram que após a instalação da sepse há um aumento na proporção de células Tregs circulantes. Porém, apesar da conhecida atuação das Tregs na imunossupressão ocorrida na sepse, alguns estudos experimentais sugerem que a ausência dessas células na instalação da síndrome não impacta positiva ou negativamente na mortalidade da doença (35).

Venet *et al.* (2009) observaram uma relação entre o aumento na população de Tregs e a anergia linfocítica desenvolvida em pacientes após um episódio de choque séptico, sugerindo que as Tregs apresentam capacidade de suprimir a resposta imune adaptativa envolvida na disfunção imunológica da sepse (42).

Cavassani *et al.* (2010) observaram, em um estudo experimental, que camundongos sobreviventes à sepse não só exibiram células Treg em expansão (naturais e induzidas), como também estiveram mais suscetíveis a crescimento de

tumores em relação a animais controle, demonstrando a atuação destas células no enfraquecimento da resposta antitumoral (43).

1.7 Monócitos em sepse

Os monócitos possuem papel tanto na imunidade inata quanto adaptativa, sendo na apresentação de antígenos a células efetoras após reconhecimento de patógenos ou DAMPs via TLR, seja por sua ação efetora na produção de óxido nítrico (NO), fagocitose, ou liberação de citocinas pró inflamatórias. Os monócitos adquirem ambiente tecidual diferenciando-se em células fagocíticas denominadas macrófagos.

A resposta inflamatória inicial é conduzida por macrófagos de ativação clássica, ou M1, que produzem altas quantidades de citocinas pró inflamatórias e espécies reativas de oxigênio. A fase de resolução da inflamação é marcada pela presença de macrófagos de ativação alternativa, M2, que produzem principalmente citocinas anti-inflamatórias e são altamente fagocíticos (44). Estes macrófagos são caracterizados pela presença de marcadores como CD163, um receptor *scavenger* (removedor) de hemoglobina (45) e o receptor de manose CD206.

Macrófagos M1 podem ser gerados *in vitro* pela presença de estimuladores como INF- γ ou LPS, enquanto que citocinas como IL-4, IL-13 e IL-10 estimulam a produção de macrófagos M2. Além disso, macrófagos M2 podem ser induzidos diretamente pela presença de linfócitos T reguladores (44).

Outro marcador importante encontrado na superfície de monócitos é uma molécula pertencente ao complexo de histocompatibilidade principal de classe II, HLA-DR. Monócitos expressam fortemente HLA-DR em sua superfície, e sua expressão se encontra diminuída em situações de imunossupressão, o que atenua consideravelmente sua eficiência na apresentação de antígenos (46). A quantificação de HLA-DR na superfície de monócitos é usada para mensuração do estado de imunossupressão de pacientes após trauma, cirurgias e sepse, além de servir como preditor de mortalidade e infecção secundária após choque séptico (47).

1.8 Citocinas em sepse

Durante a sepse, citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17) induzem a vasodilatação pela produção de óxido nítrico (NO), aumentam a coagulação e liberam metabólitos do ácido araquidônico, precursor de elementos essenciais na inflamação. Paralelamente, ocorre a liberação de mediadores anti-inflamatórios, como TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-13. O desequilíbrio entre essas duas vias altera a homeostase e contribui para a progressão da disfunção de órgãos (2, 48-50).

As citocinas pró-inflamatórias possuem papel na quimiotaxia de neutrófilos para o local da inflamação, diferenciação de células T *naïve* na linhagem Th1, ativação de células NK, morte de células apoptóticas, além da síntese de outras citocinas inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento por diversos tipos celulares como fibroblastos, células endoteliais, células epiteliais e macrófagos (51). Além disso, algumas citocinas, como IL-1 β , IL-6 e IL-8, estão relacionadas à gravidade da sepse, com níveis altos associados a um pior prognóstico. (51, 52).

Alguns estudos sugerem, porém, que são as citocinas anti-inflamatórias que estão, na verdade, predominando na instituição da sepse. Elas controlam a diferenciação e proliferação de linfócitos T e B, além de suprimir a função dos monócitos e macrófagos e promover a mudança do perfil T *helper* para Th2 (51).

Brenner *et al.* encontraram níveis elevados de IL-10 em pacientes sépticos em relação a controles saudáveis, enquanto IFN- γ e IL-2 estiveram significativamente diminuídos (53). A IL-10 é produzida por linfócitos B, Th2 e monócitos, e é promovida pela presença da IL-6, sendo capaz de bloquear a produção de citocinas inflamatórias por células mielóides, NK e linfócitos T (52). Além disso, ela estimula a produção de receptores solúveis de TNF- α e IL-1, ajudando a atenuar seus efeitos (28). Foi evidenciado que a IL-10 correlaciona-se com uma maior gravidade e pior prognóstico da sepse, sugerindo a imunossupressão de pacientes sépticos (51).

Há algumas citocinas, porém, que não são facilmente classificáveis nas respostas Th1/Th2, é o caso do eixo IL-33/ST2. A proteína ST2 está presente principalmente em mastócitos e células Th2, sendo que sua expressão pode ser induzida *in vitro* pela presença de determinadas citocinas, como IL-6 (54). O gene ST2 pode transcrever mRNA tanto para a variável solúvel (sST2) quanto para a variável transmembrana (ST2L), dependendo da forma que o promotor atua (55), e está

presente principalmente em células hematopoiéticas. A forma ST2L atua como receptor da interleucina-33 em células Th2, enquanto a forma solúvel (sST2), que se caracteriza pela ausência das partes citoplasmática e transmembrana da proteína, atua como um *decoy receptor*, ou seja, neutraliza os efeitos da IL-33 ao se acoplar à citocina e impedir sua ligação à célula.

A IL-33 funciona como uma alarmina ao ser liberada extracelularmente em caso de dano celular, funcionando como um sinal precoce de lesão tecidual e inflamação (56). Dessa forma, podemos perceber a IL-33 atuando tanto como DAMP quanto como citocina. A ação da IL-33 em linfócitos CD4+ *naive* influencia sua diferenciação em células com resposta Th2, culminando com a liberação de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) (57). Além disso, há indícios que a IL-33 esteja relacionada à defesa contra patógenos aumentando o influxo de neutrófilos ao sítio de infecção (58, 59), e também na proteção cardiovascular à fibrose e insuficiência cardíaca (57).

Como já mencionado, um dos mecanismos pelo qual a IL-33 pode ser inibida é a presença da proteína solúvel sST2. Porém, essa proteína pode atuar também diretamente nas células, como foi observado em alguns estudos. O tratamento *in vitro* com sST2 feito por Sweet *et al.* reduziu a concentração de citocinas pró-inflamatórias após administração de LPS em cultura de macrófagos (60), o que indica que há ligação de sST2 nestas células, e que esta é responsável pela diminuição da atividade inflamatória.

1.9 Hipótese do estudo

A mortalidade precoce após a instalação da sepse tem diminuído em consequência de terapias direcionadas e avanços no cuidado intensivo de pacientes, porém cada vez mais são observados efeitos a longo prazo, com a presença de infecções secundárias e mortes tardias (61), como observamos na Figura 5.

Figura 5. Gráfico mostrando a evolução da mortalidade em pacientes sépticos ao longo do tempo.

Fonte: Delano e Ward (2016) (61).

Pacientes sobreviventes à sepse podem ter uma trajetória clínica prolongada, exibindo uma inflamação e uma imunossupressão crônicas, em um fenômeno conhecido como PICS (síndrome do catabolismo e inflamação/imunossupressão persistentes) (27). Esse quadro pode levar a uma maior chance de infecções secundárias por patógenos oportunistas, além da reativação de vírus latentes (28, 62-65).

Otto *et al.* analisaram retrospectivamente os dados de 999 pacientes admitidos com sepse grave e choque séptico no Hospital Universitário de Jena (Alemanha), assim como suas evoluções durante 150 dias após a alta. Foi observado que nas fases tardias da sepse a taxa de mortalidade foi significativamente maior do que na fase precoce, além de um aumento de infecções causadas por bactérias oportunistas e fungos (63).

As complicações a longo prazo após um episódio de sepse podem ter três possíveis explicações: a sepse geralmente acontece em pessoas idosas e doentes, e causa uma deterioração na expectativa de vida e no estado funcional como um evento agudo, não-específico; há uma interação entre mecanismos específicos da sepse e

doenças pré-existentes; e/ou essas complicações estão diretamente relacionadas à infecção em si (64).

Assim, o pior prognóstico do paciente após um episódio de sepse pode estar relacionado à disfunção imune, ou seja, a presença de uma resposta anti-inflamatória, que predomina na fase tardia (28, 63).

Nascimento *et al.* (2010) observaram um aumento percentual e absoluto de células T reguladoras (Tregs), inicialmente em peritônio e linfonodos peritoniais e posteriormente no timo e baço, em um modelo experimental de sepse peritoneal em camundongos. Adicionalmente, os animais controles e os animais sobreviventes à sepse foram posteriormente submetidos a uma dose intranasal não letal de *Legionella pneumophila*. Como resultado, observou-se mortalidade de 100% nos animais sobreviventes ao primeiro episódio de sepse, e ausência de mortalidade nos animais controles, sugerindo assim uma forte relação entre os Tregs e a susceptibilidade a infecções oportunistas (66).

Apesar da intensa investigação da relação entre Tregs e disfunção imunológica, a maioria dos estudos sobre o comportamento dos Tregs e ativação de monócitos na fase tardia na sepse são estudos experimentais ou estudos clínicos pequenos com seguimento por curtos períodos. O comportamento dos Tregs durante a fase tardia da sepse e os mecanismos envolvidos na disfunção imune ao longo do tempo, mesmo após sua contagem ter voltado aos valores basais, ainda permanecem obscuros (67).

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo estudar a relação entre a atividade imunológica e a maior susceptibilidade a novas infecções e prognóstico na fase tardia da sepse. Particularmente, o comportamento das Tregs e dos monócitos nas diferentes fases da sepse, e se há correlação com a susceptibilidade a novas infecções e mortalidade. O melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos na disfunção imune poderá auxiliar o desenvolvimento de medidas específicas para proteção na fase tardia da sepse, como o desenvolvimento de imunoestimulantes, a fim de se obter um melhor prognóstico para pacientes sépticos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Determinar a relação entre as atividades imunológica e inflamatória e o prognóstico de pacientes com sepse.

2.2 Específicos

- Quantificar os linfócitos Tregs na fase inicial e tardia da sepse;
- Analisar o perfil de monócitos na fase inicial e tardia da sepse;
- Analisar o perfil de citocinas inflamatórias na fase inicial e tardia da sepse;
- Determinar diferenças clínicas, inflamatórias e imunológicas no desfecho complicação infecciosa;
- Determinar diferenças clínicas, inflamatórias e imunológicas no desfecho mortalidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Participantes do estudo

Foram incluídos pacientes nas primeiras 24h de admissão na Unidade de Emergência (UE) do HCFMRP-USP com diagnóstico clínico de sepse, sepse grave ou choque séptico, de acordo com os critérios propostos pelo *Surviving Sepsis Campaign* (68) e voluntários saudáveis.

3.2 Pacientes com sepse

O diagnóstico de sepse foi realizado pela equipe médica da UE-HCFMRP-USP, pela presença da SIRS atribuída a uma infecção. A SIRS foi definida pela presença de pelo menos dois dos seguintes critérios (5):

- Temperatura corpórea maior que 38°C ou menor que 36°C;
- Frequência cardíaca maior que 90 bpm;
- Frequência respiratória maior que 20 ipm ou PaCO₂ menor que 32 mmHg;
- Contagem de leucócitos maior que 12.000 células/mm³, menor que 4.000 células/mm³, ou presença de mais que 10% de bastonetes.

A confirmação de infecção adquirida na comunidade foi feita pela equipe médica por critérios clínicos, exames de imagem (radiografia de tórax, ultrassonografia, tomografia computadorizada), exames laboratoriais (urina I, hemograma, proteína C reativa) e microbiológicos (hemocultura, urocultura, cultura de líquido, cultura de abscesso, etc). Esses exames são rotineiramente solicitados de acordo com a suspeita clínica. Para o diagnóstico de infecção nosocomial, foram utilizados os critérios do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (69).

3.2.1 Critérios de inclusão

- Idade ≥ 18 anos, de ambos os sexos;

- Capacidade do participante ou representante legal decidir quanto à participação ou não;
- Pacientes admitidos na UE-HCFMRP/USP com diagnóstico de sepse.

3.2.2 Critérios de não-inclusão

- Uso crônico de corticosteroides (mais de 30 dias);
- Neutropenia febril;
- Doença linfoproliferativa conhecida;
- Paciente HIV positivo;
- Paciente em cuidados paliativos.

3.2.3 Critérios de exclusão

- Solicitação de exclusão do estudo por parte do paciente ou representante legal.

3.3 Acompanhamento clínico dos pacientes

O acompanhamento dos pacientes incluídos no estudo, desde a admissão até a alta hospitalar, foi feito pelos médicos assistentes e residentes da UE-HCFMRP-USP, que seguiram os protocolos clínicos para manejo da sepse, sem qualquer interferência do estudo nas condutas.

Simultaneamente, os dados clínicos e epidemiológicos foram coletados com auxílio do software RedcapTM. Este software permite delinear e gerenciar projetos de pesquisa, através da criação de formulários e calendários que permitem a organização das coletas de dados de pesquisa.

Após pelo menos três meses da alta hospitalar, pacientes sobreviventes foram contatados por telefone e convidados a retornar ao hospital para mais uma coleta de material. Foram também reportados nessa ocasião dados de acompanhamento do estado clínico do paciente, como novas infecções e internações, necessidade de medicação antibiótica e estado de saúde geral do paciente.

3.4 Dias de coleta

As coletas foram realizadas nos dias da admissão do paciente (D0), no segundo dia (D2), sétimo dia (D7), décimo quarto dia (D14), vigésimo primeiro dia (D21) e vigésimo oitavo dia (D28) de internação, até sua alta ou interrupção do seguimento (óbito ou desistência da participação), além de uma coleta após a alta hospitalar para os pacientes sobreviventes (Retorno).. Foram coletados dados clínicos e epidemiológicos, SOFA, SAPS III, APACHE II e dados de acompanhamento semanal. Para sistematizar e organizar o estudo, as datas de coleta foram criadas como “eventos” no Redcap™ e em cada evento, havia uma série de instrumentos de medição relacionada, conforme apontado na Tabela 2. Os dados clínicos reportados para cada instrumento de medição estão listados na Tabela 3.

Tabela 2: Relação Instrumentos de medição em cada dia de coleta (Eventos) no software RedCap™.

Instrumento	Admissão	D2	D7	D14	D21	D28	Retorno
Dados clínicos de admissão	X						
Resultados experimentos laboratório	X	X	X	X	X	X	X
SOFA	X	X	X	X	X	X	
SAPS III	X						
APACHE II	X						
Avaliação semanal/Complicações			X	X	X	X	

Tabela 3. Dados clínicos reportados em cada instrumento de medição criado no software RedCap™.

Dados clínicos de admissão	Nome, sexo, idade, peso, origem, data de admissão no serviço hospitalar, comorbidades, medicações em uso regular, aspectos clínicos (como temperatura axilar, frequência cardíaca, frequência respiratória, etc.), foco infeccioso, uso de droga vasoativa, antibioticoterapia iniciada, valores de lactato sérico, entre outros.
SOFA*	Valores laboratoriais como de Proteína C Reativa, procalcitonina, PaO2 de gasometria arterial, plaquetas em hemograma, bilirrubina total, creatinina sérica, diurese nas últimas 24 horas, medidas de pressão arterial, entre outros.
SAPS III*	Duração e local de internação prévia, qual o tipo de admissão, motivo da admissão, temperatura axilar, frequência cardíaca, Ph de gasometria arterial, entre outros.
APACHE II*	Medidas de pressão arterial, frequência respiratória, sódio e potássio séricos, hematócrito, PaCO2 em gasometria arterial, entre outros.
Avaliação semanal/Complicações	Se houve alta, óbito ou continuação da internação, se houve necessidade de acesso venoso central/PIC, se necessitou de ventilação mecânica, se houve complicações e infecção secundária, entre outros.

*SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; SAPS III: Simplified Acute Physiology Score; APACHE II: Severity of Disease Classification System.

Os dados clínicos registrados no software foram utilizados para compor o banco de dados dos pacientes incluídos no estudo, e para as análises de comparação com os dados experimentais obtidos posteriormente.

Adicionalmente, foram registrados a ocorrência ou não de óbito, exclusão do estudo, alta hospitalar e complicações. Consideramos como complicações o registro de hipotensão sem que o paciente tivesse essa evidência previamente e/ou uma nova infecção, seja esta relacionada a instrumentos como cateter, sonda vesical de demora e intubação oro-traqueal, ou apenas pela observação de febre e alteração nos exames laboratoriais/imagem, com consequente troca de medicação antibiótica.

3.5 Controles

O grupo controle foi composto na sua maioria por profissionais de saúde presentes na Unidade de Emergência na data da coleta. Em todos os dias que houve coleta de amostras de pacientes (D0 até retorno) foi realizada também coleta de sangue de um controle saudável, independentemente do número de pacientes.

3.6 Coleta do material e análises realizadas

Em cada momento de coleta, foram obtidos dois tubos sem anticoagulante e dois tubos com EDTA, com aproximadamente 3 mL de sangue cada. Os pacientes sobreviventes foram convidados a retornar ao HC-FMRP-USP para nova coleta, pelo menos três meses após a alta hospitalar (fase tardia).

Foram realizadas análises dos monócitos no sangue total, e a quantificação de células Tregs em PBMC (células mononucleares) e citocinas inflamatórias no soro.

3.7 Análise de monócitos

A avaliação dos monócitos foi realizada por citometria de fluxo a partir do sangue total coletado em EDTA, no mesmo dia da coleta. Para isso, foram utilizados os seguintes anticorpos: PerCP *mouse anti-human* CD14 (clone MwP9), PE *mouse anti-human* CD163 (clone GHI/61), FITC *mouse anti-human* CD206 (clone 19.2) e APC *mouse anti-human* HLA-DR (clone G46-6), todos da marca BD-Biosciences (San Diego, CA, EUA).

Em cada ensaio foi utilizado sangue de um controle saudável para compor os controles de prova, sendo uma amostra sem adição de anticorpos (controle de células), amostras com adição apenas de um anticorpo (anti-CD163, anti-CD206 e anti-HLA-DR), amostras sem adição de apenas um anticorpo (*Fluorescence minus one* – FMO) para cada marcação, além de uma amostra para mensuração dos monócitos do controle (com adição de todos anticorpos).

A marcação das amostras foi feita com 100 µL de sangue total e 100 µL dos respectivos anticorpos diluídos, em tubos FACS e protegidos da luz. Após 30 minutos armazenados em geladeira, as hemácias foram retiradas com a adição de aproximadamente 3 mL de tampão de lise ACK (Apêndice A). Após homogeneização e centrifugação a 400 rcf por 8 minutos, o sobrenadante foi descartado. Esse passo foi repetido até que as células estivessem livres de hemácias visíveis, e o pellet foi então ressuspensionado em 100 µL de PBS com formol (Apêndice A) para leitura posterior.

As células marcadas foram passadas em citômetro FACSVerse® (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), e a análise dos resultados foi feita pelo software FlowJo™ (FlowJo, LLC. Tree Star, Inc). O resultado foi expresso em porcentagem de células positivas para as moléculas CD163, CD206 e HLA-DR na população de monócitos CD14+, utilizando a técnica de subtração de histogramas descrita por Overton (70), e disponível na ferramenta *Population comparison* do software FlowJo™. A técnica utiliza a intensidade de fluorescência de cada canal para estimar a porcentagem da população de interesse que é positiva para determinado parâmetro, utilizando como base uma população controle não marcada para o mesmo, no caso, o FMO para aquele anticorpo.

3.8 Processamento das amostras de sangue total e obtenção de PBMC

O sangue total coletado com anticoagulante EDTA de cada paciente e controle foi processado após a marcação de monócitos, de modo a obter o plasma para armazenamento a -70°C e separação dos leucócitos para marcação de linfócitos Tregs. Para isso as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 650 rcf. O volume de plasma retirado foi substituído por tampão Hanks 1x (Thermo Fischer Scientific, Inc. Waltham, MA, USA).

Para obtenção das células brancas foram utilizados 2 mL de cada uma das quatro concentrações diferentes da solução de Percoll (GE Healthcare, Inc. Little Chalfont, Reino Unido) com tampão Hanks (72%, 63%, 54% e 45%) e cerca de 2,5 mL do sangue reconstituído, em um tubo cônico, nessa ordem, sempre adicionando suavemente cada solução de modo que ficassem separadas. Os tubos foram então centrifugados por 33 minutos a 650 rcf e 20°C , com aceleração e desaceleração mínimas. Após a centrifugação, as células polimorfonucleares (PMN) e as mononucleares (PBMC) se separam em diferentes gradientes, sendo possível a retirada de cada uma dessas partes em tubos diferentes.

Para purificação das células, cada tubo foi tratado com tampão de lise de hemácias (ACK) completando-se o volume do tubo com o mesmo (cerca de 14 mL) e homogeneizando gentilmente, com posterior centrifugação a 400 rcf e 4°C por 8 minutos e descarte do sobrenadante, até que todas as células vermelhas fossem retiradas da suspensão. As células purificadas foram então lavadas com tampão Hanks por duas vezes seguindo o mesmo protocolo de lise das hemácias, para garantir que todo o tampão de lise fosse retirado e não danificasse as células desejadas. Cada tubo de células foi reconstituído com 1mL de tampão RPMI para contagem das células em câmara de Neubauer.

Cerca de 5×10^6 células de PMN foram armazenadas com 1 mL de reagente Trizol[®] (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA) a -70°C para eventuais estudos posteriores. Cerca de $1,0 \times 10^6$ células de PBMC foram utilizadas para quantificação de linfócitos Tregs em citometria de fluxo.

3.9 Análise de linfócitos T reguladores (Tregs)

A avaliação dos linfócitos Tregs foi realizada por citometria de fluxo das células mononucleares (PBMC) com o uso de anticorpos monoclonais FITC *mouse anti-human* CD4 (clone RPA-T4) da marca BD Biosciences (San Diego, CA, EUA) e PE *mouse anti-human* Foxp3 (clone150D/E4) da marca eBioscience (San Diego, CA, EUA).

Em cada ensaio foram utilizadas células de um controle saudável para compor os controles de prova, sendo uma amostra sem adição de anticorpos (controle de células), uma amostra com adição apenas de anti-CD4 e uma amostra com adição apenas de anti-FoxP3, além de uma amostra para mensuração de linfócitos Tregs (com adição dos dois anticorpos).

A marcação das amostras foi feita em placas de 96 *wells*, adicionando os anticorpos a suspensões de aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células em 100 μ L de PBS 1x. Inicialmente foram adicionados 100 μ L de anti-CD4 diluído e só depois da permeabilização das células foi adicionado anti-FoxP3. Para a marcação intracelular foi utilizado o kit *Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set* (eBioscience. San Diego, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

As células marcadas foram passadas em citômetro FACSVerse® (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), e a análise dos espectros obtidos foi feita pelo software FlowJo™ (FlowJo, LLC. Tree Star, Inc). O resultado foi expresso em % de Tregs em linfócitos T CD4+, considerando Tregs as células dessa população com marcação para o fator intracelular Foxp3.

3.10 Valores absolutos de linfócitos Tregs

Para mensuração da quantidade de células Tregs por mililitro de sangue foram utilizados dados obtidos da quantificação de células em sangue total (número de leucócitos totais e diferenciais), multiplicando-se a quantidade de linfócitos pela porcentagem de Tregs e de linfócitos CD4+, conforme fórmula a seguir:

$$\text{N}^\circ \text{ Tregs (x } 10^4 \text{ células/mL)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ linfócitos (x } 10^6 \text{ células/mL)} \times \% \text{ CD4+ em linfócitos} \times \% \text{ Tregs em CD4+}}{100}$$

3.11 Avaliação da atividade inflamatória e anti-inflamatória

Para avaliação da atividade inflamatória e anti-inflamatória, foram dosados pela técnica de ELISA os marcadores: TGF- β , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-33 e ST2. Foram utilizados os soros armazenados a -80°C provenientes dos tubos sem anticoagulantes coletados em cada amostragem, para os eventos D0 (admissão), D7, D14 e retorno.

Foram utilizados kits DuoSet® ELISA R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA) para IL-33 e ST2 e BD OptEIA™ (San Diego, CA, EUA) para as demais citocinas, empregando-se as metodologias descritas nas respectivas instruções de cada kit. A leitura foi feita pelo software SoftMax® Pro 5 do aparelho SPECTRA MAX 190 (Molecular Devices, LLC) no Laboratório de Inflamação e Dor (LID) do Departamento de Farmacologia da FMRP.

3.12 Análise estatística dos dados

Para descrição dos grupos, as variáveis categóricas foram expressas em porcentagem e as variáveis contínuas em média e desvio padrão, quando distribuição normal, e mediana e intervalo interquartil, quando distribuição não-normal.

Nas análises de comparação, para variáveis categóricas foi utilizado o teste de Fisher e do Qui-Quadrado para análise entre dois grupos e vários grupos, respectivamente. Para as variáveis contínuas, foi utilizado o teste t de Student e análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni, para análise entre dois grupos e vários grupos, respectivamente. Análises não paramétricas entre grupos foram realizadas com o teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunns. Para comparação entre duas variáveis contínuas distintas foi realizado o teste de correlação de Pearson.

Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. As análises foram realizadas no *software* Prism 5™ (GraphPad Software, Inc.).

3.13 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP em 08/07/2014 (CAAE 30459114.6.0000.5440). Os voluntários desse estudo, ou seus representantes legais (em caso de incapacidade do participante), receberam informações sobre os objetivos do estudo, procedimentos envolvidos e riscos. Todos os participantes assinaram um termo de consentimento antes de qualquer participação no estudo (Apêndice B). O estudo foi conduzido em conformidade com as resoluções nacionais e internacionais como descritas nos seguintes documentos: Resolução CNS 196/96, Declaração de Helsinque e todas as suas revisões e alterações, Documento de Las Américas (71).

4. RESULTADOS

4.1 Inclusão dos pacientes

A inclusão dos pacientes foi realizada no período de outubro de 2014 a novembro de 2015, e está ilustrada no fluxograma da Figura 6.

Figura 6. Fluxo da inclusão dos pacientes no estudo.

4.2 Resumo das coletas realizadas

Foram coletados o soro e plasma dos 33 pacientes incluídos para avaliação das citocinas e perfil de células Treg, porém algumas análises da citometria de fluxo foram perdidas após o processamento das amostras, resultando em um número menor de dados do que a efetiva inclusão. Além disso, a análise de monócitos foi iniciada posteriormente às demais, tendo, portanto, um número amostral inferior. Doze

pacientes retornaram de 5 a 10 meses após a alta hospitalar (média 7 meses). Um resumo das análises feitas nos diversos momentos de coleta se encontra na Figura 7.

Figura 7. Número de amostras analisadas para cada parâmetro do estudo e em cada momento de coleta.

Pacientes D0 n=33	Pacientes D2 n=25	Pacientes D7 n=20	Pacientes D14 n=10	Pacientes D21 n=3	Pacientes D28 n=3	Pacientes Retorno n=12
<i>Avaliação de citocinas</i>						
N=33		N=17	N=10			N=10
<i>Avaliação de linfócitos Tregs</i>						
N=30	N=17	N=18	N=8	N=3	N=3	N=12
<i>Avaliação de monócitos</i>						
N=2	N=1					N=8

4.3 Características demográficas, clínicas e laboratoriais da população do estudo

Os dados clínicos e laboratoriais dos 33 pacientes incluídos no estudo estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 4. Características demográficas e clínicas dos pacientes com sepse.

Características	
Sexo ^a	
Feminino	6 (18,2)
Masculino	27 (81,8)
Idade (anos) ^b	64 ± 15
SOFA admissão ^b	7,9 ± 4,7
APACHE II ^b	18,1 ± 8,4
SAPS III ^c	40 (30-56)
Classificação ^a	
Sepse grave	22 (66,7)
Choque séptico	11 (33,3)
Desfecho ^a	
Alta	17 (51,5)
Óbito	10 (30,3)
Transferência	6 (18,2)
Índice de Comorbidades de Charlson ^b	4,6 ± 2,7

Características	
Comorbidades	
Tabagismo	23 (69,7)
Hipertensão arterial sistêmica	19 (57,6)
Etilismo	14 (42,4)
DPOC	9 (27,3)
Dislipidemia	9 (27,3)
Doença renal crônica	8 (24,2)
Diabetes mellitus	7 (21,2)
Neoplasia	7 (21,2)
Hepatopatia	6 (18,2)
Paciente acamado	6 (18,2)
Demência	5 (15,1)
Insuficiência cardíaca	4 (12,1)
IAM prévio	4 (12,1)
Obesidade	4 (12,1)
Outras	10 (30,3)
Sítio da infecção^a	
Respiratório	22 (66,7)
ITU	4 (12,1)
Pele	3 (9,1)
Abdominal	2 (6,1)
Misto	2 (6,1)
Hemocultura^a	
Negativa	23 (69,7)
Bacteria Gram-positiva	6 (18,2)
Bacteria Gram-negativa	1 (3,0)
Complicação infecciosa^a	
Sim	10 (30,3)
Não	23 (69,7)
Tempo de internação (dias)^c	11 (6-17)

SOFA = Sepsis-related Organ Failure Assessment; APACHE II = Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II; SAPS III= Simplified Acute Physiology Score III; ITU = Infecção do trato urinário. ^a variáveis expressas em n (%); ^b variáveis expressas em média $\pm$ desvio padrão; ^c variáveis expressas em mediana (intervalo interquartilico).

Dos 33 pacientes, a maioria foi do sexo masculino (82%); a média de idade foi 64 ± 15 anos; cerca de dois terços tiveram sepse grave (67%) e 11 pacientes (33%) choque séptico; e a letalidade geral durante a internação foi de 30%, sendo maior em pacientes com choque séptico (36,4%) do que com choque séptico (27,3%). Em todos pacientes foi diagnosticado o sítio da infecção, sendo as mais frequentes: infecção respiratória em 22 (67%), e infecções do trato urinário em 4 (12%) pacientes; seguidos de infecções cutâneas em três (9%), abdominais em dois (6%), e o restante com mais de uma infecção (6%).

A maioria das infecções não foi evidenciada pelo exame de hemocultura (70%). Dos agentes identificados, cinco (71%) foram *Staphylococcus* coagulase negativa, um *Streptococcus pneumoniae* e um *Escherichia coli*.

Dez pacientes (30,3%) tiveram uma complicação infecciosa durante a internação, com tempo médio de oito dias após a entrada, sendo que quatro desses desenvolveram pneumonia associada à ventilação mecânica e o restante outras complicações (ITU, abscesso, infecção abdominal). Quatro dos pacientes com complicação infecciosa foram a óbito durante a internação (40%). Dos agentes microbianos identificados em culturas e hemoculturas, a maior parte foi *Staphylococcus* coagulase negativa (3) e *Pseudomonas aeruginosa* (3), além de *Acinetobacter baumannii* (2) e *Enterobacter cloacae* (1).

Os pacientes foram divididos entre sepse grave e choque séptico, relacionando-se os grupos aos escores clínicos. Conforme esperado, houve diferenças estatisticamente significativas para os escores SOFA na admissão ($p < 0,001$), APACHE II ($p = 0,0256$) e SAPS III ($p = 0,0001$), conforme representado nas Figuras 8, 9 e 10, respectivamente, sendo estes maiores nos pacientes com choque séptico do que em pacientes com sepse grave.

Figura 8. Valores para o escore SOFA na admissão para os pacientes com sepse grave e choque séptico.

Figura 9. Valores para o escore APACHE II para os pacientes com sepse grave e choque séptico.

Figura 10. Valores para o escore SAPS III para os pacientes com sepse grave e choque séptico.

As características clínicas também foram comparadas com o desfecho dos pacientes durante a internação, sendo que a idade ($p = 0,0354$), índice de comorbidades de Charlson ($0,0133$), escores SOFA no D0 ($p = 0,0373$), SOFA no D2 ($p = 0,0116$), SOFA no D7 ($p = 0,0163$), SOFA no D14 ($p = 0,0039$), APACHE II ($p = 0,0107$) e SAPS III ($p = 0,0115$) foram significativamente maiores no pacientes foram a óbito em comparação com os pacientes que receberam alta (Figuras 11, 12 e 13). O índice de comorbidades de Charlson foi utilizado como ferramenta de cálculo de gravidade do paciente determinada por doenças pré-existentes, secundárias ao diagnóstico principal de sepse.

Figura 11. Idade e índice de comorbidades de Charlson dos pacientes que tiveram alta hospitalar e que foram a óbito.

Figura 12. Valores do escore SOFA nos momentos D0, D2, D7 e D14 para os pacientes que tiveram alta hospitalar e os que foram a óbito.

Figura 13. Valores dos escores APACHE II e SAPS III para os pacientes que tiveram alta hospitalar e os que foram a óbito.

Os pacientes foram posteriormente subdivididos em relação à presença de complicação infecciosa ou não, e comparados às demais variáveis. Observamos pela Figura 14 que houve diferenças significativas no tempo de internação dos pacientes, e nos valores do escore SOFA dos momentos D2, D7 e D14 entre os dois grupos, com valores mais altos no grupo que teve complicação infecciosa.

Figura 14. Tempo de internação e escore SOFA no D2, D7 e D14 entre os pacientes que tiveram complicação infecciosa no decorrer da internação e os que não tiveram.

4.4 Acompanhamento pacientes que tiveram alta hospitalar

Aproximadamente seis meses após a alta dos pacientes sobreviventes, foi realizado contato com os mesmos ou seus familiares. Os desfechos clínicos destes pacientes durante este período estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5. Desfechos observados no acompanhamento após a alta hospitalar.

Características	
Óbito após a alta ^a	
Sim	4 (17,4)
Não	19 (82,6)
Nova internação sobreviventes ^a	
Sim	5 (25,3)
Não	14 (74,7)
Nova infecção sobreviventes ^a	
Pneumonia	2 (10,5)
Gastroenterite	1 (5,3)
Infecção urinária	1 (5,3)

^a variáveis expressas em n (%)

4.5 Controles

Foi coletado o sangue de 34 voluntários, sendo que alguns serviram de controle por mais de uma vez durante o estudo. Os dados dos mesmos estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6. Características clínicas e demográficas dos controles.

Características	
Sexo ^a	
Feminino	9 (26,47)
Masculino	25 (73,53)
Idade (anos) ^b	28 ± 5
Comorbidades	
Depressão	2 (5,9)
Tabagismo	1 (2,9)
Obesidade	1 (2,9)
Hipotireoidismo	1 (2,9)

^a variáveis expressas em n (%); ^b variável expressa em média ± desvio padrão

4.6 Quantificação de linfócitos T reguladores

As Figuras 15 a 17 mostram a estratégia utilizada (*"gates"*) para mensuração das células Tregs a partir de PBMC dos pacientes e controles. Primeiramente foram selecionados os linfócitos dessa população, segundo características morfológicas (granulação e tamanho), conforme verificamos na Figura 15. Em seguida foram isoladas somente as células CD4⁺ de cada amostra, conforme verificamos na Figura 16.

Figura 15. Separação dos linfócitos na população total de PBMC de paciente. Os linfócitos são determinados por seu tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) característicos.

Figura 16. Determinação dos linfócitos CD4⁺ através da plotagem SSC-A x FITC-A:CD4 da população de linfócitos definida previamente.

Com as populações de linfócitos CD4+ definidas para cada amostra, a porcentagem de Tregs foi determinada através da marcação intracelular da molécula FoxP3. Para isso, foram utilizadas como base para configuração dos quadrantes os controles de marcação para cada anticorpo. Na Figura 17 temos como exemplo a quantificação de Tregs para o paciente 27 no retorno e seu respectivo controle.

Figura 17. Quantificação de Tregs exibindo no quadrante 2 sua respectiva porcentagem para cada uma das amostras, sendo estas os controles de marcação (A: linfócitos CD4+ do controle sem marcação para FoxP3 e B: linfócitos do controle marcadas apenas com foxp3 e C: linfócitos CD4+ do controle) e D: linfócitos CD4+ de paciente.

As porcentagens de linfócitos T reguladores em linfócitos CD4+ obtidas estão resumidas na Tabela 7, para todos os grupos estudados. A figura 18 ilustra as porcentagens de Tregs em linfócitos CD4+ para cada grupo estudado. Devido a um número muito pequeno de amostras para os momentos de coleta D21 e D28, estes grupos não foram inseridos no gráfico.

Tabela 7. Porcentagem de linfócitos T reguladores em linfócitos CD4+ para cada grupo estudado.

Grupos (n)	Tregs (%)
Controle (n = 51)	4,78 (4,00 – 5,88) ^b
Pacientes D0 (n = 28)	5,26 (3,77 – 6,54) ^b
Pacientes D2 (n = 15)	7,75 ± 3,49 ^a

Grupos (n)	Tregs (%)
Pacientes D7 (n = 17)	5,22 ± 3,39 ^a
Pacientes D14 (n = 8)	4,22 ± 1,70 ^a
Pacientes D21 (n = 3)	5,07 (3,59 – 5,36) ^b
Pacientes D28 (n = 3)	6,45 (4,53 – 11,80) ^b
Pacientes retorno (n = 12)	8,34 ± 3,55 ^a

^a variáveis expressas em média ± desvio padrão

^b variáveis expressas em mediana (intervalo interquartilico)

Figura 18. Representação gráfica da porcentagem de linfócitos Tregs em diversos grupos (controle e pacientes), com análise de variância entre eles.

Houve diferença significativa entre os grupos apresentados ($p = 0,0004$), sendo os valores obtidos para pacientes em retorno e no 2º dia de internação maiores em relação ao grupo controle. Essa porcentagem também foi significativamente maior no retorno em relação ao décimo quarto dia de internação, mostrando uma nova elevação dessa proporção após a alta hospitalar.

Adicionalmente, se as médias dos valores obtidos para cada grupo de pacientes forem apresentadas em formato de linha, e a compararmos com o intervalo de normalidade do grupo controle, fica ainda mais fácil observar o aumento na porcentagem de Tregs no 2º dia de internação e no retorno (Figura 19).

Figura 19. Porcentagem de Tregs em linfócitos CD4+ dos pacientes ao longo do tempo de internação e retorno, comparados ao grupo controle. Foram utilizados a média e o erro padrão da média, para cada grupo representado na linha do tempo.

4.6.1 Porcentagens de Treg no segundo dia de internação correlacionam-se com instalação de complicação infecciosa

Analisando a porcentagem de Tregs em linfócitos CD4+ separadamente para os grupos de pacientes que desenvolveram ou não complicações infecciosas, existe uma diferença estatisticamente significante no segundo dia de internação, quando pacientes que não vieram a desenvolver complicações infecciosas tiveram maiores proporções de Tregs que os demais ($p = 0,0015$). (Figura 20).

Figura 20. Valores de Treg (%) em todos os momentos de coleta para pacientes que tiveram ou não complicação infecciosa no decorrer da internação.

4.6.2 Porcentagens de Treg durante a internação não se correlacionam com a mortalidade

As porcentagens de Treg nos diversos dias de internação dos pacientes foi estatisticamente semelhante entre os pacientes que tiveram alta e os que foram a óbito (Figura 21).

Figura 21. Porcentagens de Treg durante a internação para os grupos de pacientes que foram a óbito e sobreviventes.

4.6.3 Pacientes com maiores porcentagens de Treg na admissão ficam menos tempo internados

Ao correlacionarmos o tempo de internação de cada paciente que não foi a óbito durante a internação com suas porcentagens de linfócitos Treg em linfócitos CD4+ na admissão, observamos uma relação inversamente proporcional, cuja correlação estatística foi significativa (Figura 22).

Figura 22. Interpolação gráfica entre a porcentagem de Tregs na admissão dos pacientes sobreviventes com seu tempo de internação.

4.6.4 Número absoluto de linfócitos Treg

Para aprofundar o entendimento dos valores de Tregs, foram calculadas as quantidades absolutas de células por mL no sangue dos pacientes e controles. O gráfico representado na Figura 23 mostra os valores de Tregs ($\times 10^4$ células/mL) para cada grupo, observando-se um aumento significativo após a alta em relação à admissão ($p = 0,0074$).

Figura 23. Representação gráfica da quantidade de células Tregs por mL de sangue total para cada grupo estudado.

Para visualização global da variação dos subtipos celulares, leucócitos, linfócitos totais, linfócitos CD4+ e Tregs estão inseridos em conjunto no gráfico da Figura 24.

Figura 24. Variação da quantidade de diversos tipos celulares no sangue total para cada grupo estudado.

Os valores de leucócitos variaram entre os grupos ($p = 0,0002$), tendo os controles um número médio de células inferior aos pacientes nos momentos D0, D2, D7 e D14. Já para os linfócitos (totais e CD4+), não houve diferença entre os grupos.

4.6.5 Correlação entre o número absoluto de Tregs e o valor do escore SOFA

A quantidade de células Treg não se correlacionou com o escore de gravidade SOFA em nenhum dos momentos estudados, porém, houve uma inversão da tendência com o passar do tempo (Figura 25).

Figura 25. Correlação de Tregs e SOFA em diversos momentos da internação.

4.7 Monócitos

Para mensuração das células positivas de cada molécula de interesse, primeiramente os monócitos foram isolados do total de eventos obtidos no citômetro de fluxo, dispondo-se a dispersão lateral no eixo y com a fluorescência para CD14 no eixo x, tendo como base uma amostra sem marcação para CD14, conforme observamos na Figura 26.

Figura 26. Seleção da população de interesse para análise de monócitos (CD14+).

A avaliação das células positivas para CD163, CD206 e HLA-DR foi feita na população de monócitos CD14+ previamente isolada para cada amostra, prosseguindo-se com a técnica de subtração de histogramas de Overton, e com o uso de amostras controle para as moléculas desejadas (FMO), conforme ilustrado nas Figuras 27 a 29.

Figura 27. Ilustração da determinação da porcentagem de células positivas para CD163 do paciente 19 no retorno e seu respectivo controle.

Figura 28. Ilustração da determinação da porcentagem de células positivas para CD206 do paciente 24 no retorno e seu respectivo controle.

Figura 29. Ilustração da determinação da porcentagem de células positivas para HLA-DR do paciente 30 na admissão e seu respectivo controle.

A avaliação dos monócitos na admissão dos pacientes foi prejudicada pelo pequeno número de amostras analisadas ($n=2$), sendo mais evidentes os resultados obtidos em relação ao retorno dos pacientes ($n=8$). Mesmo com essa restrição, os três marcadores estudados (CD163, CD206 e HLA-DR) foram avaliados por ANOVA entre os três grupos (controle, D0 e retorno), além da performance do teste t de student para comparação das populações controle e pacientes no retorno. Os resultados expressos em porcentagem de células positivas para as moléculas CD163, CD206 e HLA-DR estão resumidos na Tabela 8.

Tabela 8. Porcentagem de células positivas em monócitos CD14+, para os parâmetros analisados.

	Controle	D0	Retorno
CD163 (%)	60,27 ± 15,16 ^a	78,63 (78,01 – 79,24) ^b	76,75 ± 17,17 ^a
CD206 (%)	6,12 (3,05 – 26,73) ^b	4,77 (3,27 – 6,28) ^b	21,98 ± 14,52 ^a
HLA-DR (%)	93,05 ± 4,46 ^a	74,27 (61,27 – 87,26) ^b	96,08 (94,53 – 97,05) ^b

^a variáveis expressas em média ± desvio padrão

^b variáveis expressas em mediana (intervalo interquartilico)

Houve um aumento significativo de monócitos CD163+ nos pacientes sépticos no retorno em relação aos controles ($p = 0,036$), conforme ilustrado na Figura 30.

Figura 30. Porcentagem de células positivas para a molécula CD163 nos monócitos CD14+ de indivíduos controles e pacientes sépticos na admissão e retorno.

A positividade para CD206 também foi maior nos pacientes no retorno do que na população controle, como observamos na Figura 31, porém essa diferença não foi significativa ($p = 0,064$).

Figura 31. Porcentagem de células positivas para CD206 nos monócitos CD14+ do grupo controle e grupo de pacientes na admissão e retorno.

Além disso, o número de células positivas para a molécula HLA-DR foi menor nas duas amostras de pacientes no momento da inclusão, comparado aos grupos controle e retorno ($p = 0,0057$), conforme observamos na Figura 32.

Figura 32. Porcentagem de células positivas para a molécula HLA-DR nos monócitos CD14+ de indivíduos controles e pacientes sépticos durante a internação e após a alta hospitalar.

4.8 Citocinas

Os valores obtidos para citocinas na admissão, durante a internação e no retorno nos grupos de pacientes e controles estão resumidos na Tabela 9.

Tabela 9. Mediana e intervalo interquartílico dos valores das citocinas analisadas para cada grupo de pacientes e controles.

	Controles	D0	D7	D14	Retorno
IL-6	8,32 (4,46-18,95)	431,1 (56,64-1125)	149,6 (61,81-581,5)	114,7 (66,85-174,2)	19,25 (10,36-49,51)
IL-8	7,98 (6,28-12,51)	73,0 (37,2-167,3)	56,7 (27,21-89,16)	42,58 (30,01-82,72)	12,88 (9,83-16,92)
TNF-α	33,2 (29,41-121,5)	33,56 (27,43-66,65)	32,93 (30,18-69,94)	33,02 (30,31-155,8)	33,38 (27,43-40,95)
IL-33	30,31 (10,38-102,3)	30,82 (4,33-194,2)	27,44 (2,42-347,3)	21,8 (3,23-224,5)	45,29 (10,88-956,5)
ST2	611,2 (513,1-846,5)	4419 (2060-10294)	1197 (955,6-6564)	1084 (641,1-2224)	632,5 (338,8-1069)
IL-4	0,0 (0,0-21,22)	0,0 (0,0-1,17)	0,0 (0,0-0,86)	0,0 (0,0-9,24)	0,0 (0,0-0,0)
IL-10	0,0 (0,0-45,98)	47,13 (15,88-221,9)	27,52 (14,8-62,13)	15,0 (6,74-40,34)	632,5 (338,8-1069)
TGF-β	1523 (23,07-5101)	561,4 (91,10-2744)	1578 (676,9-3770)	2057 (594,8-2834)	1282 (102,6-2489)

A análise de variância das citocinas para os grupos de pacientes e controles mostrou uma diferença significativa entre os grupos para IL-6, IL-8, IL-10 e ST2, conforme Figura 33. Os valores de IL-6 e IL-8 dos pacientes foram superiores aos dos controles durante a internação (D0, D7 e D14) ($p < 0,0001$ em ambos), enquanto que os valores de ST2 estiveram elevados nos pacientes em relação ao grupo controle somente na admissão (D0) ($p < 0,0001$), e de IL-10 na admissão e retorno dos

pacientes ($p = 0,0030$). Para IL-4, IL-33, TNF- α e TGF- β não houve diferença significativa entre os grupos estudados, como pode ser observado na Figura 34.

Figura 33. Valores das citocinas IL-6, IL-8, IL-10 e ST2 em pg/ml para cada grupo avaliado e a diferença entre eles.

Figura 34. Valores das citocinas IL-4, IL-33, TNF- α e TGF- β em pg/ml para cada grupo avaliado.

Os valores de ST2 na admissão correlacionaram-se com os valores do escore SOFA e com o tempo de internação dos pacientes que tiveram alta, conforme ilustrado na Figura 35. Além disso, os valores de ST2 diferiram entre os pacientes que sobreviveram à sepse e os que vieram a óbito ($p = 0,0114$), como podemos ver na Figura 36. A citocina ST2 correlacionou-se inversamente com IL-33 e diretamente com IL-6, IL-8 e IL-10 na admissão (Figura 37).

Figura 35. Correlação entre os valores do escore SOFA e a citocina ST2 na admissão dos pacientes e correlação entre o tempo de internação dos pacientes e os valores da citocina ST2 na admissão.

Figura 36. Valores da citocina ST2 para os grupos de pacientes que vieram a óbito e que sobreviveram à sepse.

Figura 37. Correlação entre os valores obtidos para as citocinas IL-33 e ST2 na admissão dos pacientes.

4.8.1 Valores das citocinas nos pacientes com complicação infecciosa

Os pacientes que tiveram complicação infecciosa durante a internação tiveram valores das citocinas IL-8 e ST2 significativamente elevados na admissão em relação aos pacientes que não apresentaram complicação infecciosa ($p = 0,0387$ e $p = 0,0356$, respectivamente) (Figura 38).

Figura 38. Evolução durante o tempo de internação e retorno das citocinas em pacientes que tiveram ou não complicação infecciosa.

■ Sem complicação infecciosa
● Complicação infecciosa

5. DISCUSSÃO

5.1 Inclusão e dados clínicos dos pacientes

O presente estudo avaliou prospectivamente 33 pacientes admitidos entre outubro de 2014 a novembro de 2015 com diagnóstico clínico de sepse, segundo os critérios estabelecidos pela ACCP/SCCM (4). A idade média desta população (64 anos) corrobora estudos epidemiológicos prévios, que demonstraram que a idade é um fator de risco para sepse (19, 72). O risco relativo da incidência de sepse em uma pessoa idosa (>65 anos) é de 13,1 em relação a indivíduos jovens, segundo um estudo observacional realizado entre 1979 e 2002 nos EUA (73). Além disso, a idade de nossos pacientes esteve relacionada positivamente à mortalidade intra-hospitalar, em conformidade com estudos anteriores (31). O aumento da mortalidade em idosos com sepse pode ser explicado por alterações imunes, principalmente em relação à imunidade adaptativa; potencial má nutrição; presença de comorbidades; exposição a patógenos em indivíduos residentes em clínicas ou hospitalizados; dependência de instrumentos médicos invasivos; maior fragilidade (menor massa corpórea, função renal e hepática mais lentas, confusão mental, etc), entre outros fatores (31, 74).

A letalidade observada nesse estudo (30,3%) foi menor do que a relatada em estudos brasileiros abrangentes, como o recém divulgado SPREAD, que avaliou a prevalência e mortalidade da sepse em UTIs brasileiras em um único dia de recrutamento em 2014, e obteve uma mortalidade geral de 55,7% (18); o COSTS, com 43,8% de letalidade em pacientes sépticos admitidos entre 2003 e 2004 (75); e o BASES, com mortalidades de 46,9% e 52,2% em pacientes com sepse grave e choque séptico, respectivamente, admitidos de 2001 a 2002 (17). Além disso, um recente estudo brasileiro que avaliou a implementação de protocolos gerenciados de sepse em hospitais públicos revelou que, em departamentos de emergência, a mortalidade de pacientes sépticos admitidos entre setembro de 2010 e agosto de 2012 nas instituições participantes foi de 46,3 % (76). Ou seja, mesmo levando em consideração somente pacientes que provêm do mesmo tipo de internação, a letalidade foi maior do que a observada no presente estudo.

A letalidade observada foi também menor do que a encontrada por nosso grupo previamente (51%), em uma inclusão de 74 pacientes feita de agosto/2012 a dezembro/2013 no mesmo hospital (77), principalmente se observarmos apenas o grupo de pacientes com choque séptico (36,4% vs 73% do estudo anterior). Esta redução pode ser resultado de uma maior efetividade no tratamento direcionado aos pacientes por parte do hospital, fato que vem sendo observado nos hospitais brasileiros, de acordo com o relatório do ILAS com dados de letalidade de 2005 a 2016 (Figura 1).

O sítio primário de infecção de nossa população de estudo foi o pulmonar (67%), o mesmo observado por nós previamente (77) e também por outros estudos brasileiros (18, 25) e internacionais (78). Em relação ao diagnóstico confirmatório da infecção, é notório que o exame de hemocultura pode transcorrer em resultados falso negativos quando da instalação de uma infecção sistêmica (79). A antibioticoterapia precoce, a necessidade de uma quantidade grande de sangue na coleta para positividade do teste e/ou várias coletas seriadas, e a presença de bactérias decrescimento lento acabam por dificultar o cultivo de microrganismos presentes no sangue de pacientes com sepse (80). Aqui, comprovamos esta dificuldade pela baixa porcentagem de pacientes com detecção de patógenos na hemocultura (69,7% das hemoculturas solicitadas foram negativas), assim como já havíamos descrito anteriormente (detecção em apenas 30% das amostras de pacientes com sepse) (77).

Os escores clínicos SOFA, APACHE II e SAPS 3 realizam a avaliação do estado geral dos pacientes, estratificando-os por gravidade e extensão dos danos fisiológicos, o que auxilia os clínicos a selecionar tratamentos e alocar recursos, além de prover dados epidemiológicos a serem utilizados em estudos clínicos (81). A obtenção desses escores pelo corpo clínico da UE-HCFMRP realizada no presente estudo, nos mostra que estes dados estão intimamente ligados ao desfecho de morte hospitalar, como também na gravidade da sepse (classificação entre sepse grave ou choque séptico), podendo servir como preditores de mortalidade.

Pudemos observar também pela descrição clínica e epidemiológica da nossa população que a presença de comorbidades prévias é fator importante tanto para o estabelecimento da sepse quanto para predição de mortalidade. De todos os pacientes incluídos, somente um não possuía nenhum tipo de comorbidade descrita,

dentre afecções neurológicas, pulmonares, renais, hepáticas e sistêmicas. A presença do tabagismo (69,7%), etilismo (42,4%) e hipertensão arterial sistêmica (57,6%) foram as mais observadas entre os pacientes. O índice de comorbidades de Charlson foi utilizado para a comparação quantitativa entre os pacientes sobreviventes e os que morreram durante a internação, nos mostrando uma diferença estatisticamente significativa entre essas subpopulações, com um índice superior entre os não sobreviventes, o que corrobora com um estudo prévio realizado em um departamento de emergência da Turquia, demonstrando que este índice pode ser utilizado na predição de mortalidade em sepse (82).

5.2 Complicações infecciosas durante a internação

Um dos objetivos desse estudo foi descrever as alterações imunológicas relacionadas com o desenvolvimento de uma complicação infecciosa durante a internação, visto que pacientes com sepse podem estar mais propensos a desenvolver uma nova infecção. Observamos neste trabalho uma taxa relativamente alta (30,3%) de complicação, sendo a maioria por pneumonia associada à ventilação mecânica. Corroborando com este dado, em se tratando de infecções adquiridas em ambiente hospitalar, um estudo realizado de 2005 a 2009 em UTIs das Filipinas apontou que pneumonias associadas à ventilação mecânica representaram 67,2% de todas as infecções nosocomiais adquiridas; enquanto que outro estudo, em hospital terciário da Índia em 2014, infecções nosocomiais tiveram prevalência de 36,4% dentre pacientes em uso de VM (83, 84).

Em nosso estudo, observamos que a gravidade do comprometimento orgânico ao longo da internação foi um dos fatores que contribuíram para o desenvolvimento de uma complicação infecciosa, visto que pacientes com escores SOFA mais elevados nos momentos D2, D7 e D14 tiveram maior probabilidade de adquirir uma complicação. Essa observação também foi feita por van Vught *et al.* em um grande estudo realizado em hospitais terciários da Holanda, no qual foi detectada associação da complicação infecciosa hospitalar com os escores de gravidade na admissão (SOFA, APACHE IV) e a presença de choque séptico (85). Isso nos leva a supor que uma maior disfunção orgânica pode afetar também a capacidade do paciente de lidar com novos

patógenos, embora não possamos estabelecer causalidade entre as duas condições. Porém, ao contrário do estudo feito por van Vught *et al.*, em nossa população a presença de complicação infecciosa não esteve relacionada com maior mortalidade intra-hospitalar, provavelmente devido ao baixo número amostral.

Além disso, pudemos também observar uma correlação positiva entre tempo maior de internação dos pacientes e a presença de complicação. Sabe-se que o tempo prolongado de internação aumenta os riscos de uma nova infecção, visto que intervenções hospitalares como ventilação mecânica, sonda vesical de demora e cateter intravenoso podem levar à colonização por bactérias oportunistas em pacientes que estão com a imunidade comprometida (86), como estafilococos não produtores de coagulase (SCN) e *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria com alta afinidade à colonização de aparelhos respiratórios com produção de biofilme (87). Em nosso estudo os microrganismos encontrados em novas culturas de sangue, secreção traqueal, secreção de vias aéreas e ponta de cateter, solicitadas após a complicação, foram exatamente esses (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus hominis*, *S. capitis* e *S. epidermidis*), além de *Acinetobacter baumannii*.

5.3 Acompanhamento dos pacientes com alta hospitalar

Todos os pacientes que tiveram alta hospitalar foram contatados após cerca de seis meses, para acompanhamento dos desfechos, incluindo óbito e novas internações. Como esperado, uma parcela considerável dos pacientes foi a óbito nesse período (17,4%), e dos demais, um quarto foi hospitalizado novamente, com presença de novas infecções. Essa tendência já havia sido reportada por Wang *et al.*, que acompanharam sobreviventes à sepse e pacientes controles por um ano, mostrando que a sepse prévia foi responsável por um risco relativo independente de 2,83 vezes para novas infecções, de 3,78 vezes para novas internações, e de 4,36 vezes para mortalidade, mesmo ajustando o modelo para diversas variáveis clínicas e demográficas (62).

5.4 Linfócitos T reguladores

Neste estudo nós quantificamos células Tregs no sangue dos pacientes e controles por citometria de fluxo, através da presença do fator de transcrição Foxp3 nos linfócitos CD4+. Dessa maneira, nosso objetivo foi descrever a ação supressora efetiva das Tregs na circulação periférica, considerando que a molécula Foxp3 é parte fundamental nessa ação.

Conseguimos perceber que em relação à porcentagem de Treg em linfócitos CD4+, há uma elevação nos pacientes em relação a controles saudáveis, tanto no segundo dia de internação quanto após a alta nos pacientes sobreviventes, o que vai de encontro com nossa hipótese inicial, corroborada por diversos estudos (72, 88), de que a sepse induz a imunossupressão tardia, com observação de um aumento desse tipo celular.

Uma das hipóteses difundidas na literatura para o aumento do percentual de Tregs em pacientes sépticos em relação a controles saudáveis é a diminuição dos valores absolutos de linfócitos CD4+CD25- (89). Por esse motivo, calculamos também o valor absoluto de células Treg no sangue dos controles e dos pacientes em todos os dias de coleta, além dos valores de leucócitos e linfócitos totais. Embora a contagem total de leucócitos dos controles seja inferior à dos pacientes em quase todos os momentos de coleta, não há diferenças especificamente em relação aos linfócitos, inclusive na porção de linfócitos T CD4+. Com isso, conseguimos perceber que os valores totais de células Treg por mm³ de sangue dos pacientes e controles acompanham o padrão observado nos resultados proporcionais (% em linfócitos CD4+), ou seja, aumentaram no 2º dia de internação e após a alta, embora no D2 a variação entre os indivíduos tenha sido grande, o que pode ter sido responsável pela falta de significância estatística na diferença entre os outros grupos. No retorno, todavia, houve um aumento de células treg estatisticamente significativo quando comparado com o dia da admissão.

A ligeira depleção de linfócitos observada no D2 de internação é responsável pela alta porcentagem de Tregs em linfócitos CD4+ neste momento, provavelmente pela perda dos outros tipos celulares de linfócitos CD4. Porém, mesmo não tendo diferença estatística, a média do número absoluto de Tregs no D2 foi ainda assim maior que no D0 e nos controles (5,384 vs 4,11 e 4,396, respectivamente). A elevação de Tregs no D2 nos leva a acreditar que esta seja uma resposta mais lenta do que a

resposta pró-inflamatória inicial, que já está presente no dia da admissão dos pacientes. Isso pode significar que o organismo tenta compensar a inflamação inicial com a maior produção destas células moduladoras. Porém, vemos que já no D7 a produção de Tregs diminui, vindo a aumentar somente após a resolução da sepse e alta hospitalar.

A elevação na proporção de linfócitos T reguladores entre linfócitos T CD4+ tem implicações diretas na imunorregulação, dada a função que estas células possuem de inibição da inflamação. Para esclarecer se essa inibição teve efeitos práticos no prognóstico dos pacientes, analisamos a relação dos valores encontrados destas células com os escores de gravidade, a letalidade intra-hospitalar e a presença de uma complicação infecciosa durante a internação.

Apesar de observarmos uma tendência de associação inversamente proporcional entre o escore SOFA e a quantidade de células Tregs no sangue (tanto absoluta quanto percentual) nas primeiras coletas (D0 e D2) e que se altera no decorrer da internação, não houve diferenças estatísticas significativas em nenhuma comparação, da mesma maneira como demonstrado por Venet *et al.* (89). A associação inversa de SOFA com porcentagens de Treg na admissão já havia sido demonstrada por Hein *et al.* com pacientes que apresentaram choque, séptico ou não (88).

A relação das Tregs com a mortalidade de pacientes sépticos já foi demonstrada anteriormente tanto como associação inversa, tendo as Tregs uma função protetora (88), quanto como associação direta, com o aumento de Tregs favorecendo a letalidade (37, 90). Em nossa população não houve associação significativa, embora possamos observar uma pequena diferença no momento D2, tendo os pacientes sobreviventes um maior número absoluto de Tregs em sua circulação periférica do que pacientes que foram a óbito. Como a mortalidade dos pacientes está intimamente ligada com a gravidade da doença, era de se esperar que sua relação com o número de Tregs acompanhasse a relação obtida para o escore SOFA, ou seja, no segundo dia de internação os pacientes que possuem mais Tregs no sangue tem gravidade e letalidade menores que pacientes com menos Tregs.

A possível proteção das Tregs no início da sepse se reflete na associação de uma maior porcentagem de Tregs no D2 com a ausência de complicação infecciosa

durante a internação. Porém, essa associação não é significativa quando analisamos o número absoluto de Tregs ($p = 0,10$), isso pode ser justificado pelo número de linfócitos do D2, que é ligeiramente menor que nos demais momentos da coleta. Além disso, dentre os pacientes sobreviventes, aqueles com maiores porcentagens de Treg na admissão ficam menos tempo internados, ou seja, se recuperam da doença mais rapidamente.

Em resumo, vimos que a presença de Tregs é superior no início da infecção (D2 de coleta) e após a resolução da sepse (retorno); no início da internação sua presença é benéfica em relação à recuperação mais rápida e instalação de uma nova infecção; e que, ao contrário do que o difundido por alguns autores, a porcentagem elevada de Tregs em pacientes sépticos não é totalmente explicada pela depleção de outros tipos de linfócitos.

5.5 Monócitos

Um dos marcadores mais reconhecidos para debilidade de pacientes críticos é a mensuração de HLA-DR na superfície dos monócitos, já que esta molécula reflete a funcionalidade destas células, estando correlacionada com sua capacidade de apresentação de antígenos e liberação de citocinas inflamatórias (46). Consistente com este fundamento, pacientes na admissão tiveram porcentagens inferiores desta molécula na superfície de seus monócitos, comparados com os controles. Embora o número amostral neste grupo seja pequeno, a consolidação teórica deste resultado valida as informações obtidas. O mais interessante, no entanto, é a observação de que essa diminuição se resolve após a alta dos pacientes, diferentemente da molécula CD163 e da porcentagem de células Tregs.

Em um ambiente de respostas Th2, com citocinas anti-inflamatórias liberadas no meio extracelular, principalmente IL-4, IL-13 e IL-10 (91), favorece-se a diferenciação monocítica em ativação alternativa (M2), que pode ser detectada por moléculas de superfície como CD163 e CD206. A elevação destas moléculas nos monócitos de pacientes no retorno evidencia uma convergência para esse tipo de ativação dos monócitos, mesmo quando a sepse já foi resolvida. Esse resultado é condizente com a elevação de Tregs no retorno, visto que essas células também são

responsáveis pela regulação positiva tanto de CD163 quanto CD206 na superfície de monócitos (44).

A diminuição da expressão de HLA-DR e a ativação da via alternativa de monócitos costumam vir atreladas, em um estado de imunossupressão, porém a expressão de um marcador não é necessariamente condicionada à falta do outro, como foi observado por Hudig *et al.* em um estudo sobre a heterogeneidade de monócitos entre indivíduos (92).

Como a maioria de nossas análises em monócitos foi realizada no retorno dos pacientes, é difícil fazer uma comparação com outros estudos, visto que não é comum pesquisadores analisarem esse tipo de informação em um tempo tão grande após a alta hospitalar. Porém, o perfil de monócitos de ativação alternativa em pacientes sépticos durante a internação foi observado por diversos autores. Brunialti *et al.* observaram aumento da expressão de CD163 e CD206 nos monócitos de pacientes sépticos em relação a controles saudáveis (91); Groselj-Grenc *et al.* conseguiram discriminar crianças e recém nascidos com sepse de pacientes com SIRS sem infecção através de valores de CD163 em seus monócitos (45).

Em resumo, os resultados da expressão de HLA-DR juntamente com as moléculas CD163 e CD206 em monócitos circulantes sugerem que a capacidade de apresentação de antígenos está comprometida em pacientes sépticos durante a internação, mas volta ao normal com a resolução da sepse, ao contrário da liberação de mediadores químicos, que continua convergindo para a liberação de citocinas anti-inflamatórias em um fenótipo de ativação alternativa mesmo após a alta, o que condiz com os resultados obtidos para linfócitos T reguladores.

5.6 Citocinas

Na instalação da sepse no organismo, vários mecanismos imunológicos agem concomitantemente, resultando em um grande aumento no nível plasmático de mediadores inflamatórios. As citocinas fazem parte desse grupo, e são altamente pleiotrópicas, podendo ter diversos efeitos em diferentes organismos, dependendo do meio em que são liberadas. A presença de diferentes proporções de receptores, antagonistas e reguladores naturais é capaz de modular a resposta do corpo às

substâncias liberadas, fazendo com que as citocinas não tenham, portanto, papéis completamente definidos e engessados (26).

Podemos observar em nosso estudo, que houve nos pacientes um aumento significativo tanto de citocinas pró-inflamatórias como anti-inflamatórias. Os níveis de IL-6 e IL-8 encontrados nos soros estiveram elevados em relação aos controles desde a admissão até o último dia investigado (D14), e retornaram ao normal após a alta (retorno), mostrando que a inflamação perdura durante a internação, mas se resolve com a dissolução da síndrome. Além disso, valores de IL-8 na admissão foram maiores em pacientes que apresentaram alguma complicação infecciosa durante a internação, porém não houve correlação com a mortalidade. A IL-8 já foi reportada em pacientes sépticos que desenvolveram complicações não infecciosas anteriormente (93), assim como associada à mortalidade (94-96).

Já os níveis de IL-10 somente estiveram elevados durante a internação dos pacientes no dia de admissão (D0), retornando aos valores normais já na primeira semana (D7), porém estiveram também altos no retorno dos pacientes, mostrando uma mudança de panorama inflamatório dos pacientes que sobreviveram à sepse após a alta.

Para TNF- α e TGF- β , não houve qualquer discrepância entre os controles e os dias de coleta dos pacientes, e para IL-4 os valores foram na maioria das vezes indetectáveis, o que pode ter contribuído para a homogeneidade das respostas. Além disso, podemos ver que os valores de IL-33 estão elevados somente no retorno, embora não tenha atingido diferença na análise de variância entre todos os grupos, mas juntamente com os valores altos de IL-10, concluímos que após a alta os pacientes sobreviventes têm predominância de respostas anti-inflamatórias em relação a pessoas saudáveis.

O que mais nos chama a atenção, porém, são os resultados elevados da forma solúvel do receptor ST2 na admissão dos pacientes, já que além de serem estatisticamente diferentes dos controles, também mostraram uma associação tanto à mortalidade quanto à presença de complicação infecciosa durante a internação e também ao tempo de internação dos pacientes sobreviventes.

A sST2 é amplamente estudada em afecções alérgicas e auto-imunes como asma, lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide, o que sugere que ela exerça

um papel na homeostase de respostas Th1/Th2, porém, já foi observada grande implicação do seu papel na sepse e choque séptico, inclusive diretamente correlacionada à mortalidade dos pacientes (97). Recentemente, Krychtiuk *et al.* obtiveram uma resposta semelhante em pacientes consecutivamente admitidos em uma UTI da Áustria, com predição de mortalidade por valores altos de sST2 combinados com valores indetectáveis de IL-33 na admissão, embora não tenha havido correlação entre essas duas citocinas (98).

Para entendermos a contribuição desse marcador para a imunopatologia em nossos pacientes, devemos compreender primeiramente sua função fisiológica. Antes da descoberta da IL-33 como ligante do receptor ST2, Trajkovic *et al.* sugeriram que sST2 estivesse diretamente envolvida em uma resposta anti-inflamatória pela regulação negativa de TLR4 em macrófagos (99), ao mesmo tempo em que Brint *et al.* mostraram que há inibição dos receptores TLR4 e IL-1RI, e que a presença de ST2 garante a tolerância a endotoxinas (LPS), visto que sua ausência associou-se à mortalidade e aumento nos níveis séricos de IL-6 e IL-12 em camundongos (100). No entanto, após o conhecimento de que sST2 atua como armadilha para evitar a ligação de IL-33 ao seu receptor, o papel dessa molécula pode ser associado a uma inibição de respostas Th2 mediadas, exercendo, portanto, papel oposto ao que havia sido encontrado previamente.

Seja com efeitos pró ou anti-inflamatórios, a exacerbação dessa citocina no soro dos pacientes na data de admissão e diagnóstico de sepse, e sua relação com a mortalidade, complicação infecciosa e tempo de internação, nos leva a concluir que este seja um marcador confiável para o estabelecimento de um mau prognóstico da doença.

Interessantemente, no dia de admissão seus valores estiveram negativamente correlacionados aos valores de IL-33, o que pode indicar a eficiência na sua função inibitória, já que ao contrário de sST2, os valores de IL-33 não tiveram nenhuma correlação com o escore de gravidade e disfunção de órgãos, SOFA, apesar de sabermos que esta citocina é uma alarmina liberada em situações de dano celular. Nas coletas seguintes não houve nenhuma correlação entre as duas citocinas, e no retorno, essa correlação foi exatamente o oposto da encontrada na admissão, ou seja, quanto mais IL-33 no soro de cada paciente, mais sST2 esse paciente possuía. Talvez

isso possa ser explicado pelo retorno a níveis basais de inflamação nos pacientes em retorno, ou seja, após a alta não há interferência de mecanismos inflamatórios exacerbados, e os valores que encontramos de sST2 são exclusivamente derivados da presença de IL-33 por isso estão correlacionados.

5.7 Considerações finais

Nossa hipótese inicial previa que complicações observadas durante a instalação da sepse, como uma nova infecção, estariam relacionadas à imunossupressão adquirida nesse período. Adicionalmente, também há indícios que a imunossupressão celular vem acompanhada de mediadores pró-inflamatórios extracelularmente, ou seja, o mau prognóstico dos pacientes sépticos está relacionado a um estado descontrolado de hiperinflamação e imunossupressão sobrepostos. Van Vught *et al.* demonstraram que valores elevados de IL-6, IL-8 e IL-10, além da ativação do endotélio vascular e sistema de coagulação, estão relacionados com a presença de complicação na internação, seja infecciosa ou não (85). Osuchowski *et al.* defendem a hipótese de que desde o início da infecção os pacientes sépticos encontram-se em um estado MARS (*mixed anti-inflammatory response syndrome*), com liberação de elementos pró e anti-inflamatórios concomitantemente, e não sequencialmente (101).

Ao levarmos em consideração a combinação dos elementos estudados neste estudo, entendemos que quanto mais dano celular e distúrbio na homeostase, mais difícil fica para o organismo controlar os mecanismos inflamatórios e compensatórios, gerando uma alteração imunológica persistente. Isso fica evidente ao analisarmos o perfil dos pacientes no retorno, com um tempo relativamente grande após a resolução da sepse inicial. Neste cenário, seria comum deduzirmos que o perfil imunológico destes pacientes voltasse ao estado basal, semelhante a pessoas saudáveis, porém observamos que isso não é verdade, pelos valores encontrados de linfócitos T reguladores circulantes, porcentagem de monócitos de ativação alternativa e citocinas de resposta Th2.

Esse achado pode significar dois fatos distintos: após a resolução da sepse o paciente continua com efeitos anti-inflamatórios prolongados, favorecendo o

estabelecimento de novas infecções e até a morte; os efeitos anti-inflamatórios são na verdade os responsáveis pela sobrevivência desses pacientes durante a internação.

A primeira hipótese tem evidência quando observamos o acompanhamento dos pacientes que tiveram alta (Tabela 5), nos quais o índice de mortalidade após a alta foi de 17,4%, além de novas internações e infecções dos que não foram a óbito após a alta (25% dos pacientes sobreviventes foram internados novamente em algum momento entre a alta e o retorno). Infelizmente, o baixo número amostral não nos permite correlacionar a mortalidade após alta com os marcadores inflamatórios, como foi feito por Yende *et al.*, em que valores altos tanto de IL-6 quanto de IL-10 antes da alta foram preditores de mortalidade no ano seguinte (102).

A segunda hipótese apresenta indícios na observação de associação da inflamação exacerbada com instalação de uma complicação infecciosa, como valores altos de IL-8 e ST2 na admissão (Figura 38), além das correlações inversas entre a porcentagem de linfócitos Treg no D2 e o estabelecimento de complicação (Figura 20); e sua porcentagem na admissão com tempo de internação dos pacientes sobreviventes (Figura 22).

Apesar da dualidade dos eventos ocorridos na sepse, podemos inferir que na fase precoce da sepse a exacerbação da inflamação é prejudicial ao prognóstico, com favorecimento aos pacientes que apresentam uma resposta compensatória rapidamente. Porém, na fase tardia o prevaletimento do estado anérgico se torna prejudicial, sendo interessante uma abordagem terapêutica justamente na etapa de recuperação da sepse.

É importante lembrar que este é um estudo observacional, sem qualquer inferência aos mecanismos celulares que levam aos resultados encontrados, os quais refletem meramente o estado imunológico dos pacientes naquele momento de coleta. Podemos conjecturar a fisiopatologia da doença através de nossas observações, porém não foi realizado nenhum teste *in vitro* com a presença de estimuladores ou inibidores para que possamos chegar a uma conclusão causal dos eventos encontrados.

Para que possamos aplicar os resultados obtidos em estudos observacionais da fisiopatologia da sepse a possíveis alvos terapêuticos, devemos ter em mente os

marcadores mais precisos a serem investigados quando do diagnóstico dos pacientes, a fim de que sejam selecionados perfis que possam de fato se beneficiar de tais estratégias. Abordagens imunoestimulantes, que vêm sendo estudadas atualmente para contrapor a imunossupressão derivada da sepse, somente devem ser utilizadas em indivíduos comprovadamente neste estado, ao contrário a terapia pode se tornar além de inútil, perigosa. Alguns marcadores utilizados no presente estudo são candidatos a este papel, notavelmente os linfócitos T reguladores e a diminuição da expressão de HLA-DR em monócitos, além de algumas citocinas pró e anti-inflamatórias. Além disso, a proteína solúvel ST2 pode ser utilizada também como marcador de mau prognóstico, como observamos neste estudo.

5.8 Limitações do estudo

Este estudo utilizou dados clínicos e laboratoriais de pacientes admitidos na Unidade de Emergência do HCFMRP em um dado período de inclusão. Partimos do princípio que a data de entrada do paciente no hospital é o início da sepse, porém, este é um ponto de grande variabilidade entre indivíduos, já que algumas pessoas procuram ajuda médica no início dos sintomas enquanto outras demoram mais para chegar ao hospital. Além disso, este é um estudo prospectivo no qual não foram consideradas possíveis internações anteriores devido ao mesmo problema. Sabemos que muitos pacientes possuem histórico de repetição de internação, e em muitas ocasiões a sepse é diagnosticada e tratada mais de uma vez, por muitas vezes com atendimento em outras instituições.

Além disso, o número amostral utilizado pode não ser suficiente para representar a grande heterogeneidade da população susceptível à sepse, principalmente no Brasil, onde a variação de fatores genéticos é especialmente grande.

Outra limitação do nosso estudo foi a inclusão de controles jovens, não pareados em idade com os pacientes. Apesar de sabermos que a idade por si só é um fator que pode levar a alterações imunológicas, alguns estudos provaram que as diferenças entre controles jovens e idosos não é significativa, tanto para citocinas inflamatórias quanto para a mensuração de células Tregs (72). Apesar disso, seria

interessante a inclusão de um grupo controle não saudável, de pacientes internados e sem sepse, para observação dos fatores devidos exclusivamente à doença. Por questões técnicas e restrições de recursos, essa inclusão não foi possível.

A avaliação dos monócitos foi prejudicada pelo pequeno número amostral de pacientes na admissão e durante a internação com análise para este tipo celular, o que não foi possível por problemas técnicos. Além disso, seria interessante que as moléculas de HLA-DR fossem quantificadas em termos de anticorpos por célula para facilitar a comparação com resultados de outros centros, mas isso somente seria possível se fosse utilizada outra metodologia.

Uma limitação na mensuração das citocinas inflamatórias é a obtenção de valores de proteínas livres no soro apenas, não sendo possível a mensuração de substâncias ligadas a células ou receptores. Além disso, a liberação dos mediadores no organismo é cíclica, enquanto que as coletas de sangue dos pacientes são realizadas apenas em momentos predeterminados.

6. CONCLUSÃO

Levando em consideração todos os elementos estudados neste trabalho, concluímos que os linfócitos T reguladores exercem importante papel na imunorregulação dos pacientes sépticos já no início da internação, tendo neste momento papel protetor quanto ao estabelecimento de novas infecções. Porém, mesmo após a alta, os pacientes sobreviventes continuam exibindo características anti-inflamatórias, tanto em relação a células Treg e monócitos de ativação alternativa, quanto na liberação de citocinas. Essa persistência no perfil imunológico de pacientes sobreviventes à sepse pode estar relacionada com problemas observados após a alta, como novas infecções e morte tardia. Além disso, concluímos que a proteína sST2 é um excelente marcador de mau prognóstico na sepse, tanto em relação à morbidade quanto mortalidade, e pode ser usada como ferramenta clínica em unidades de emergência.

REFERÊNCIAS

1. Geroulanos S, Douka ET. Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive Care Med.* 2006;32(12):2077.
2. Sagy M, Al-Qaqaa Y, Kim P. Definitions and pathophysiology of sepsis. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2013;43(10):260-3.
3. Bone RC. Why new definitions of sepsis and organ failure are needed. *Am J Med.* 1993;95(4):348-50.
4. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992;20(6):864-74.
5. 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;101(6):1644-55.
6. Poeze M, Ramsay G, Gerlach H, Rubulotta F, Levy M. An international sepsis survey: a study of doctors' knowledge and perception about sepsis. *Crit Care.* 2004;8(6):R409-13.
7. Vincent JL. Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you.. *Crit Care Med.* 1997;25(2):372-4.
8. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003;31(4):1250-6.
9. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):801-10.
10. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* 1996;22(7):707-10.
11. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003;348(16):1546-54.
12. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med.* 2007;35(5):1244-50.

13. Adhikari NK, Fowler RA, Bhagwanjee S, Rubenfeld GD. Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet*. 2010;376(9749):1339-46.
14. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2013;5(1).
15. Mayr FB, Yende S, Linde-Zwirble WT, Peck-Palmer OM, Barnato AE, Weissfeld LA, et al. Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. *JAMA*. 2010;303(24):2495-503.
16. Rhee C, Dantes R, Epstein L, Murphy DJ, Seymour CW, Iwashyna TJ, et al. Incidence and Trends of Sepsis in US Hospitals Using Clinical vs Claims Data, 2009-2014. *JAMA*. 2017;318(13):1241-9.
17. Silva E, Pedro MeA, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care*. 2004;8(4):R251-60.
18. Machado FR, Cavalcanti AB, Bozza FA, Ferreira EM, Angotti Carrara FS, Sousa JL, et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. *Lancet Infect Dis*. 2017.
19. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(3):259-72.
20. Kaukonen KM, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA*. 2014;311(13):1308-16.
21. Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Crit Care Med*. 2012;40(3):754-61.
22. Levy MM, Artigas A, Phillips GS, Rhodes A, Beale R, Osborn T, et al. Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2012;12(12):919-24.
23. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*. 2006;34(2):344-53.
24. Beale R, Reinhart K, Brunkhorst FM, Dobb G, Levy M, Martin G, et al. Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry. *Infection*. 2009;37(3):222-32.

25. ILAS. Relatório Nacional - Protocolos Gerenciados de Sepse. [ilas.org.br]: Instituto Latino Americano da Sepse; 2017.
26. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. 1997;112(1):235-43.
27. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16045.
28. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013;369(9):840-51.
29. van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(7):407-20.
30. Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ*. 2016;353:i1585.
31. Iskander KN, Osuchowski MF, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Stepien D, Valentine C, et al. Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. *Physiol Rev*. 2013;93(3):1247-88.
32. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(12):862-74.
33. Venet F, Lepape A, Monneret G. Clinical review: flow cytometry perspectives in the ICU - from diagnosis of infection to monitoring of injury-induced immune dysfunctions. *Crit Care*. 2011;15(5):231.
34. Yang WY, Shao Y, Lopez-Pastrana J, Mai J, Wang H, Yang XF. Pathological conditions re-shape physiological Tregs into pathological Tregs. *Burns Trauma*. 2015;3(1).
35. Wisnoski N, Chung CS, Chen Y, Huang X, Ayala A. The contribution of CD4⁺ CD25⁺ T-regulatory-cells to immune suppression in sepsis. *Shock*. 2007;27(3):251-7.
36. Hori S, Sakaguchi S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect*. 2004;6(8):745-51.
37. Huang LF, Yao YM, Dong N, Yu Y, He LX, Sheng ZY. Association between regulatory T cell activity and sepsis and outcome of severely burned patients: a prospective, observational study. *Crit Care*. 2010;14(1):R3.
38. Ohkura N, Sakaguchi S. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol*. 2010;32(2):95-106.

39. Cao C, Ma T, Chai YF, Shou ST. The role of regulatory T cells in immune dysfunction during sepsis. *World J Emerg Med.* 2015;6(1):5-9.
40. Taylor AL, Llewelyn MJ. Superantigen-induced proliferation of human CD4+CD25- T cells is followed by a switch to a functional regulatory phenotype. *J Immunol.* 2010;185(11):6591-8.
41. Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol.* 2004;4(11):841-55.
42. Venet F, Chung CS, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)/CD25 (+)/CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med.* 2009;35(4):678-86.
43. Cavassani KA, Carson WF, Moreira AP, Wen H, Schaller MA, Ishii M, et al. The post sepsis-induced expansion and enhanced function of regulatory T cells create an environment to potentiate tumor growth. *Blood.* 2010;115(22):4403-11.
44. Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJ, John S, Taams LS. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(49):19446-51.
45. Groselj-Grenc M, Ihan A, Derganc M. Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: comparison of fluorescence intensities and calculated indexes. *Mediators Inflamm.* 2008;2008:202646.
46. Döcke WD, Höflich C, Davis KA, Röttgers K, Meisel C, Kiefer P, et al. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem.* 2005;51(12):2341-7.
47. Landelle C, Lepape A, Voirin N, Tognet E, Venet F, Bohé J, et al. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med.* 2010;36(11):1859-66.
48. Celes MR, Prado CM, Rossi MA. Sepsis: going to the heart of the matter. *Pathobiology.* 2013;80(2):70-86.
49. Vincent J-L, Abraham E. The Last 100 Years of Sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2006;173(3):256-63.
50. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003;348(2):138-50.
51. Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, Ali MM, McGuire F, Nagarkatti PS, et al. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo.* 2013;27(6):669-84.
52. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol.* 2017;39(5):517-28.

53. Brunner M, Krenn C, Roth G, Moser B, Dworschak M, Jensen-Jarolim E, et al. Increased levels of soluble ST2 protein and IgG1 production in patients with sepsis and trauma. *Intensive Care Med.* 2004;30(7):1468-73.
54. Meisel C, Bonhagen K, Löhning M, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Radbruch A, et al. Regulation and function of T1/ST2 expression on CD4+ T cells: induction of type 2 cytokine production by T1/ST2 cross-linking. *J Immunol.* 2001;166(5):3143-50.
55. Bergers G, Reikerstorfer A, Braselmann S, Graninger P, Busslinger M. Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. *EMBO J.* 1994;13(5):1176-88.
56. Palmer G, Gabay C. Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(6):321-9.
57. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(10):827-40.
58. Alves-Filho JC, Sônego F, Souto FO, Freitas A, Verri WA, Auxiliadora-Martins M, et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med.* 2010;16(6):708-12.
59. Lan F, Yuan B, Liu T, Luo X, Huang P, Liu Y, et al. Interleukin-33 facilitates neutrophil recruitment and bacterial clearance in *S. aureus*-caused peritonitis. *Mol Immunol.* 2016;72:74-80.
60. Sweet MJ, Leung BP, Kang D, Sogaard M, Schulz K, Trajkovic V, et al. A novel pathway regulating lipopolysaccharide-induced shock by ST2/T1 via inhibition of Toll-like receptor 4 expression. *J Immunol.* 2001;166(11):6633-9.
61. Delano MJ, Ward PA. Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? *J Clin Invest.* 2016;126(1):23-31.
62. Wang T, Derhovanessian A, De Cruz S, Belperio JA, Deng JC, Hoo GS. Subsequent infections in survivors of sepsis: epidemiology and outcomes. *J Intensive Care Med.* 2014;29(2):87-95.
63. Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rödel J, Menge K, Reinhart K, et al. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care.* 2011;15(4):R183.
64. Leibovici L. Long-term consequences of severe infections. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(6):510-2.
65. Perl TM, Dvorak L, Hwang T, Wenzel RP. Long-term survival and function after suspected gram-negative sepsis. *JAMA.* 1995;274(4):338-45.

66. Nascimento DC, Alves-Filho JC, Sônego F, Fukada SY, Pereira MS, Benjamim C, et al. Role of regulatory T cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis. *Crit Care Med*. 2010;38(8):1718-25.
67. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(3):260-8.
68. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med*. 2013;41(2):580-637.
69. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control*. 1988;16(3):128-40.
70. Overton WR. Modified histogram subtraction technique for analysis of flow cytometry data. *Cytometry*. 1988;9(6):619-26.
71. BRASIL MDSD. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos: Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Ministério da Saúde Fundação Osvaldo Cruz Rio de Janeiro; 1998.
72. Saito K, Wagatsuma T, Toyama H, Ejima Y, Hoshi K, Shibusawa M, et al. Sepsis is characterized by the increases in percentages of circulating CD4+CD25+ regulatory T cells and plasma levels of soluble CD25. *Tohoku J Exp Med*. 2008;216(1):61-8.
73. Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med*. 2006;34(1):15-21.
74. Starr ME, Saito H. Sepsis in Old Age: Review of Human and Animal Studies. *Aging Dis*. 2014;5(2):126-36.
75. Sogayar AM, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grion CM, Lobo SM, et al. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. *Pharmacoeconomics*. 2008;26(5):425-34.
76. Machado FR, Ferreira EM, Schippers P, de Paula IC, Saes LSV, de Oliveira FI, et al. Implementation of sepsis bundles in public hospitals in Brazil: a prospective study with heterogeneous results. *Crit Care*. 2017;21(1):268.
77. Gozzi A. O papel da reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico etiológico da sepse. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2014.
78. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*. 2009;302(21):2323-9.

79. Weinstein MP, Doern GV. - A Critical Appraisal of the Role of the Clinical Microbiology Laboratory in the Diagnosis of Bloodstream Infections Y1 - 2011/09/01. - Journal of Clinical Microbiology. (- 9 Supplement):- S26.
80. Zadroga R, Williams DN, Gottschall R, Hanson K, Nordberg V, Deike M, et al. Comparison of 2 blood culture media shows significant differences in bacterial recovery for patients on antimicrobial therapy. Clin Infect Dis. 2013;56(6):790-7.
81. Juneja D, Singh O, Nasa P, Dang R. Comparison of newer scoring systems with the conventional scoring systems in general intensive care population. Minerva Anesthesiol. 2012;78(2):194-200.
82. Çıldır E, Bulut M, Akalın H, Kocabaş E, Ocakoğlu G, Aydın Ş. Evaluation of the modified MEDS, MEWS score and Charlson comorbidity index in patients with community acquired sepsis in the emergency department. Intern Emerg Med. 2013;8(3):255-60.
83. Navoa-Ng JA, Berba R, Galapia YA, Rosenthal VD, Villanueva VD, Tolentino MC, et al. Device-associated infections rates in adult, pediatric, and neonatal intensive care units of hospitals in the Philippines: International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) findings. Am J Infect Control. 2011;39(7):548-54.
84. Nair V, Sahni AK, Sharma D, Grover N, Shankar S, Chakravarty A, et al. Point prevalence & risk factor assessment for hospital-acquired infections in a tertiary care hospital in Pune, India. Indian J Med Res. 2017;145(6):824-32.
85. van Vught LA, Wiewel MA, Hoogendijk AJ, Frencken JF, Scicluna BP, Klein Klouwenberg PMC, et al. The Host Response in Patients with Sepsis Developing Intensive Care Unit-acquired Secondary Infections. Am J Respir Crit Care Med. 2017;196(4):458-70.
86. Mayon-White RT, Duce G, Kereselidze T, Tikomirov E. An international survey of the prevalence of hospital-acquired infection. J Hosp Infect. 1988;11 Suppl A:43-8.
87. Lima JLDC, Alves LR, Paz JNPD, Rabelo MA, Maciel MAV, Morais MMC. Analysis of biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with ventilator-associated pneumonia. Rev Bras Ter Intensiva. 2017;29(3):310-6.
88. Hein F, Massin F, Cravoisy-Popovic A, Barraud D, Levy B, Bollaert PE, et al. The relationship between CD4+CD25+ regulatory T cells and inflammatory response and outcome during shock states. Crit Care. 2010;14(1):R19.
89. Venet F, Pachot A, Debard AL, Bohé J, Bienvenu J, Lepape A, et al. Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. Crit Care Med. 2004;32(11):2329-31.

90. Chen K, Zhou QX, Shan HW, Li WF, Lin ZF. Prognostic value of CD4(+)CD25(+) Tregs as a valuable biomarker for patients with sepsis in ICU. *World J Emerg Med.* 2015;6(1):40-3.
91. Brunialti MK, Santos MC, Rigato O, Machado FR, Silva E, Salomao R. Increased percentages of T helper cells producing IL-17 and monocytes expressing markers of alternative activation in patients with sepsis. *PLoS One.* 2012;7(5):e37393.
92. Hudig D, Hunter KW, Diamond WJ, Redelman D. Properties of human blood monocytes. II. Monocytes from healthy adults are highly heterogeneous within and among individuals. *Cytometry B Clin Cytom.* 2014;86(2):121-34.
93. Fujishima S, Sasaki J, Shinozawa Y, Takuma K, Kimura H, Suzuki M, et al. Serum MIP-1 alpha and IL-8 in septic patients. *Intensive Care Med.* 1996;22(11):1169-75.
94. Bozza FA, Salluh JJ, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care.* 2007;11(2):R49.
95. Mera S, Tatulescu D, Cismaru C, Bondor C, Slavcovici A, Zanc V, et al. Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. *APMIS.* 2011;119(2):155-63.
96. Marty C, Misset B, Tamion F, Fitting C, Carlet J, Cavaillon JM. Circulating interleukin-8 concentrations in patients with multiple organ failure of septic and nonseptic origin. *Crit Care Med.* 1994;22(4):673-9.
97. Hoogerwerf JJ, Tanck MW, van Zoelen MA, Wittebole X, Laterre PF, van der Poll T. Soluble ST2 plasma concentrations predict mortality in severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2010;36(4):630-7.
98. Krychtiuk KA, Stojkovic S, Lenz M, Brekalo M, Huber K, Wojta J, et al. Predictive value of low interleukin-33 in critically ill patients. *Cytokine.* 2017.
99. Trajkovic V, Sweet MJ, Xu D. T1/ST2--an IL-1 receptor-like modulator of immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(2-3):87-95.
100. Brint EK, Xu D, Liu H, Dunne A, McKenzie AN, O'Neill LA, et al. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol.* 2004;5(4):373-9.
101. Osuchowski MF, Craciun F, Weixelbaumer KM, Duffy ER, Remick DG. Sepsis chronically in MARS: systemic cytokine responses are always mixed regardless of the outcome, magnitude, or phase of sepsis. *J Immunol.* 2012;189(9):4648-56.
102. Yende S, D'Angelo G, Kellum JA, Weissfeld L, Fine J, Welch RD, et al. Inflammatory markers at hospital discharge predict subsequent mortality after pneumonia and sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(11):1242-7.

APÊNDICE A - Soluções preparadas**Tampão fosfato-salino (PBS) 10x**

80g NaCl
2g KCl
14,4g Na₂HPO₄
2,4g KH₂PO₄
qsp 1L água deionizada

PBS formol

100mL PBS 1x (pH 7,4)
4g CH₂O
1mL NaN₃ 10%

Solução lavagem (ELISA)

2L PBS 1x
1mL Tween 20
pH 7,2 – 7,4

Solução diluente (ELISA)

200mL PBS 1x
2g BSA (albumina do soro bovino)
pH 7,2 – 7,4

Tampão lise de hemácias (ACK)

8,29g NH₄Cl 0,15M
2,00g KHCO₃ 10mM
0,074g Na₂EDTA 0,1mM
qsp 1L água deionizada
pH 7,2

APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido

Protocolo de pesquisa: Avaliação longitudinal de fatores inflamatórios e linfócitos T reguladores em pacientes sépticos

O(A) Sr(a). está com uma infecção que envolve todo o seu corpo. Estas infecções podem ser graves e os médicos têm muita dificuldade em encontrar o tratamento certo porque cada pessoa pode ter uma resposta diferente ao tratamento dependendo da idade, de outras doenças que possa ter, etc. Nós estamos convidando o sr(a) a participar de uma pesquisa científica na qual pretendemos saber o que acontece com o sistema de defesa dos pacientes e quais alterações de exames que identificam os pacientes com maiores chances de receber alta, de ficar com sequela em algum órgão (como o rim) ou de nunca mais voltar a ter a qualidade de vida que apresentavam antes (alguns podem não voltar mais a trabalhar, ficar dependente de respirador ou com fraqueza muscular generalizada). Com o melhor entendimento que esta pesquisa pode trazer, esperamos, no futuro, melhorar o tratamento para esta doença e evitar essas complicações que citamos. Para isso, coletaremos amostras de sangue (15 mL de sangue) nas primeiras 24 horas da doença, 48 horas depois, no sétimo dia, no décimo quarto dia, no vigésimo primeiro dia, no vigésimo oitavo dia, com 03 meses, 06 meses e 12 meses). Esta quantidade de sangue não fará falta para o(a) sr(a). Neste sangue iremos dosar a quantidade de uma célula do sistema de defesa chamada linfócito T regulador e o funcionamento de outra célula do sistema de defesa chamada monócito. Faremos ainda com o sangue a dosagem de substâncias que surgem na atividade inflamatória e anti-inflamatória (citocinas). Estes exames serão analisados juntamente com os exames que o sr(a) já irá fazer para o seu tratamento. Além disso, consultaremos o seu prontuário médico durante o tempo da pesquisa para verificação de dados clínico-laboratoriais. Por fim, após a sua alta hospitalar, solicitaremos o retorno do(a) sr(a) ao nosso hospital para repetir os mesmos exames e preenchimento de um questionário onde avaliaremos se a doença provocou alteração na sua qualidade de vida. Esses retornos serão solicitados após 3 meses, 6 meses e 12 meses. Caso o(a) sr(a) não retorne entraremos em contato para acompanhamento clínico e saber sobre seu estado de saúde. O incômodo para o senhor será no momento da coleta, pela picada da agulha e a necessidade de retornos sequenciais ao hospital para continuar realizando os exames. Já os benefícios serão a possibilidade de entender melhor essa doença que é tão perigosa e mata tanta gente no mundo todo, possibilidade de descobrir exames que mostrem precocemente os pacientes mais graves ou com maior risco de complicações e dessa forma melhorar o tratamento dos nossos pacientes. A sua participação no

nosso estudo é voluntária e o senhor não receberá nada por isso. Caso o(a) senhor(a) não queira participar, isso não fará com que deixe de receber o tratamento adequado para o seu problema, da mesma forma que participar da pesquisa não implicará qualquer prejuízo ao tratamento proposto. Além disso, caso o(a) senhor(a) aceite participar do estudo, será assegurada a liberdade para, em qualquer momento, retirar o consentimento em participar do mesmo, sem qualquer prejuízo ao seu cuidado e tratamento neste hospital. Nós garantimos ao(a) senhor(a), o esclarecimento de quaisquer dúvidas sobre o estudo antes e durante o curso da pesquisa, e que as informações sigilosas obtidas durante a pesquisa não serão reveladas, sendo garantida a sua privacidade. Após o término desse estudo, apresentaremos os resultados e conclusões dos dados obtidos em eventos e revistas científicas. O(a) Sr(a) ou seu responsável legal assinarão a autorização em duas vias, permanecendo uma via em posse do pesquisador para arquivamento e outra será entregue ao seu responsável legal. Desde já agradecemos a sua participação em nosso estudo.

Eu, _____, _____ anos, REG HC N° _____
aceito participar do estudo Quantificação de fatores inflamatórios e linfócitos T reguladores em
pacientes sépticos, tendo sido informado e estando de acordo com as condições do mesmo.

Assinatura do paciente (quando capaz): _____

Assinatura do representante legal: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Testemunha 01: _____

Testemunha 02: _____

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Pesquisadores: Prof. Dr. Marcos Borges e Aline Gozzi
Tel: (16) 3602-1211 ou 3602-1243
Unidade de Emergência HCFMRP/USP