#### Ana Carolina Costa Redondo

# Avaliação da resposta inflamatória e da resposta imune inata na célula apresentadora de antígeno em recém-nascidos de termo com sepse tardia

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Pediatria Orientadora: Profa. Dra. Maria Esther Jurfest Rivero Ceccon

SÃO PAULO 2013

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Redondo, Ana Carolina Costa

Avaliação da resposta inflamatória e da resposta imune inata na célula apresentadora de antígeno em recém-nascidos de termo com sepse tardia / Ana Carolina Costa Redondo. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Pediatria.

Orientador: Maria Esther Jurfest Rivero Ceccon.

Descritores: 1.Sepse/imunologia 2.Imunidade inata 3.Recém-nascido 4.Receptor 2 toll-like 5.Receptor 4 toll-like 6.Infecções bacterianas 7.Fungos 8.Interleucinas/sangue 9.Células dendríticas 10.Monócitos 11.Estudos prospectivos 12.Citometria de fluxo

USP/FM/DBD-328/13

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus amados pais e irmã pelo incentivo constante e apoio incondicional. Tê-los ao meu lado proporcionou a coragem nos momentos de desânimo e a alegria da alma para reconhecer as vitórias. Só assim pude alcançar uma conquista tão especial.

A meu marido mais que amado cujas palavras sempre me ajudaram a seguir em frente e fazer o melhor. Percorrer esse caminho juntos nos fortaleceu e tornou todos os momentos especiais.

#### **AGRADECIMENTOS**

À Deus por sempre me dar forças para caminhar com alegria e me ajudar a enxergar o próximo como irmão;

À Profa. Dra. Maria Esther Jurfest Revero Ceccon, minha orientadora e madrinha cujo incentivo e confiança foram inspiração para seguir seu exemplo de liderança e serenidade;

À Dra. Ana Lucia Acquesta, chefe dedicada, que me abraçou integralmente como parte da equipe e contribuiu para tornar esse trabalho realidade;

À toda equipe do Laboratório de Investigação Médica (LIM-36), em especial a Dra. Patricia Palmeira, Camila Quinello e Ana Lucia Silveira-Lessa, que com muita paciência e extrema dedicação tornaram possível as análises deste trabalho. Sem sua ajuda este sonho não seria concretizado;

Ao Prof. Dr. Werther Brunow de Carvalho, presidente da Comissão de Pós-Graduação Senso Estrito e Titular da Neonatologia do Instituto da Criança pela oportunidade; À toda equipe médica da UCINE pelas muitas palavras de incentivo e valiosa colaboração para o seguimento deste trabalho;

Às enfermeiras da UCINE, em especial a Angela Midori e Carla Tragante, pelo apoio constante. Sua disposição e prontidão em ajudar tornaram esta etapa muito melhor;

Aos colegas de trabalho da UCINE e do Hospital Geral do Pirajussara que foram peça fundamental no seguimento deste trabalho;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por financiar um projeto ambicioso do qual este trabalho pertence (Processo N° 2009/54246-5);

À Mônica Souza pela gentileza e atenção;

Aos recém-nascidos e seus pais por acreditarem gentilmente numa possibilidade de melhor compreensão do ser humano e cederem seu tempo, corpo e alma para este estudo.

# NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

# SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	

**ABSTRACT** 

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	10
2.1 Gerais	11
2.2 Específicos	11
3 MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Local do estudo	13
3.2 Critérios de inclusão	13
3.3 Critérios de exclusão	13
3.4 Critérios clínicos de sepse	13
3.5 Critérios laboratoriais gerais	15
3.6 Exames laboratoriais específicos	18
3.6.1 Caracterização dos leucócitos do sangue periférico por	
Imunofenotipagem	18
3.6.2 Dosagem de citocinas nas amostras de soro de RN saudáveis e con	
sepse	21
3.6.3 Amostras controle de sangue de adultos saudáveis	22
3.7 Análise Estatística	22
3.8 Delineamento do estudo	23
4 RESULTADOS	24
4.1 Análise dos dados demográficos e caracterização dos Grupos 1 e 2	25
4.2 Citocinas séricas	30

4.3 Caracterização dos leucócitos presentes no sangue periférico por					
Imunofenotipagem	32				
4.4 Caracterização das células dendríticas (DCs)	35				
4.5 Caracterização dos monócitos	42				
4.6 Caracterização dos linfócitos T (LT)	48				
4.7 Caracterização dos linfócitos B (LB)	51				
5 DISCUSSÃO	55				
5.1 Citocinas	56				
5.1.1 Citocinas pró-inflamatórias	57				
5.1.2 Citocinas anti-inflamatórias	58				
5.2 Caracterização das células dendríticas (DCs)	60				
5.3 Caracterização dos monócitos	61				
5.4 Caracterização dos linfócitos T (LT)	63				
5.5 Caracterização dos linfócitos B (LB)	65				
6 CONCLUSÕES	67				
7 LIMITES DO ESTUDO E SUGESTÃO	69				
7.1 Limites do estudo	70				
7.2 Sugestão	70				
8 ANEXOS	71				
9 REFERÊNCIAS	97				

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1 - Ativador proteico-1

APCs - Células apresentadoras de antígenos

C - Complemento

CD14/TLR-

- Complexo receptor de lipopolissacáride

CD40 - Cluster of differentiation 40

CD86 - Cluster of differentiation 86

DCs - Células dendríticas

E. coli - Escherichia coli

EGB - Estreptococos do grupo B

FACS - Fluorescence Activated Cell Sorter

IFN-δ - Interferon gama

IL - Interleucina

IQR - Intervalo interquartil (p25-p75)

IRAK - Receptor quinase da interleucina 1

LPS - Lipopolissacárides

LRR - Repetições ricas em leucina

MAPKs - Proteínas quinases ativadas por mitogeno

MFI - Mediana da intensidade de fluorescência

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

MyD88 - Fator 88 de diferenciação Mielóide

NF-κB - Fator nuclear kappa B

PAMPs - Padrões moleculares associados aos patógenos

PCR - Proteína C reativa

PRRs - Receptores com padrão de reconhecimento

RN - Recém-nascido

SHR - Escore hematológico de Rodwell

TIR - Receptor Toll-interleucina 1

TIRAP - TRIF e TRAM

TLR - Receptor Toll-like

TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa

TRAF-6 - TNF receptor associated factor

UCINE - Unidade de cuidados intensivos neonatal

# **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Compreensão atual dos fatores que contribuem para o estado do sistema imunológico de uma criança
Figura 2 – Padrão de expressão leucocitária dos TLR nos leucócitos e especificidade dos PAMPs4
<b>Figura 3 -</b> A) Principais relações entre TLR, seus adaptadores, proteínas quinases e efeitos na sinalização intracelular; Fonte: Beutler, 2004 B) Principais formas de detecção de componente de leveduras pelo hospedeiro. Fonte: Dostert et al., 2007
<b>Figura 4 -</b> Mudanças dependentes da faixa etária no padrão de interleucinas após estímulo in vitro com agonistas do TLR
<b>Figura 5 -</b> A) Distribuição dos RN do grupo 1 conforme o número de sistemas com sinais e/ou sintomas de infecção, PCR e SHR. B) Número total de pacientes com determinado sinal e/ou sintoma para cada sistema. N= número; TGI= trato gastrointestinal, SNC= sistema nervoso central
<b>Figura 6 -</b> Dosagem das citocinas no soro de RN dos grupos 2, Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico no dia do diagnóstico clínico
<b>Figura 7 -</b> Mediana ± IQR da contagem de leucócitos totais (10 <sup>9</sup> /L) nas amostras de sangue periférico
<b>Figura 8 -</b> Mediana ± IQR da contagem de leucócitos totais (10 <sup>9</sup> /L) nas amostras de sangue periférico de RN dos grupos 1 (Sepse, Sepse Grave, Choque Séptico), 2 e 3
Figura 9 - Gate realizado nas populações de neutrófilos (N) e monócitos (M) tendo como parâmetro o tamanho (forward scatter, FSC) e granulosidade
celular (side scatter, SSC)34

grupos 1, 2 e 3. DC: célula dendrítica. * = valor significativamente menor quando comparado ao grupo 2 e 3	
<b>Figura 11</b> - Mediana ± IQR da frequência (%) e MFI das populações de células dendríticas mielóides (CD11c) e plasmocitóides (CD123) que expressam os marcadores dos TLR-2 e TLR-4 em amostras de sangue periférico nos grupos 1, 2 e 3. DC: célula dendrítica	
<b>Figura 12</b> - Avaliação do TLR-2 e do TLR-4 através da mediana ± IQR da frequência (%) e MFI nas populações de células dendríticas mielóides (CD11c) e plasmocitóides em amostras de sangue periférico dos grupos 1 com cultura positiva para bactérias Gram positivas (Gram +), bactérias Gram negativas (Gram -), Fungos e com cultura negativa (Cultura -); grupo 2 e grupo 3	
<b>Figura 13</b> - Avaliação do TLR-2 e do TLR-4 através da mediana ± IQR da frequência (%) e MFI nas populações de células dendríticas mielóides (CD11c) e plasmocitóides em amostras de sangue periférico dos grupos 1 com Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico, grupo 2 e grupo 3	
<b>Figura 14 -</b> Mediana ± IQR do número absoluto (células/μL) e frequência (%) de monócitos em amostras de sangue periférico nos grupos 1, 2 e 3	
<b>Figura 15 -</b> Mediana ± IQR da frequência (%) e MFI da população de monócitos e dos marcadores de ativação CD80 e CD86, e dos receptores TLR-2 e 4 em amostras de sangue periférico dos grupo 1, 2 e 3	
Figura 16 - Mediana ± IQR da frequência (%) e MFI em monócitos referente aos receptores TLR-2 e 4 em amostras de sangue periférico dos grupo 1, 2 e 3	
<b>Figura 17 -</b> Mediana ± IQR do MFI do TLR-2 e da frequência do TLR-4 em monócitos de sangue periférico de RN dos grupos 1 com cultura positiva (bactéria Gram positiva, bactéria Gram negativa), grupo 1 com cultura negativa e de sangue periférico dos grupos 2 e 3	
Figura 18 - Mediana $\pm$ IQR da frequência e do MFI do TLR-2 e 4 em monócitos	

positiva, bactéria Gram negativa), com cultura negativa e de sangue periférico dos grupos 2 e 3
Figura 19 - Mediana ± IQR do número absoluto (células/μL) e da frequência (%) da população de linfócitos T total em amostras de sangue periférico dos grupos 1, 2 e 3
<b>Figura 20 -</b> Mediana ± IQR da frequência (%) das populações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> em amostras de sangue periférico dos grupos 1, 2 e 3. T CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> : Linfócito T; LT <i>naive</i> : CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> ; LT efetor: CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>low</sup> CD69 <sup>+</sup> ; LT memória central: CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> ; LT memória efetora: CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>-</sup> CD27
<b>Figura 21 -</b> Mediana ± IQR da frequência (%), MFI e DP das populações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> CD28 e CD25 em amostras de sangue periférico dos grupos 1, 2 e 3
<b>Figura 22 -</b> Mediana ± IQR do número absoluto (células/μL) e da frequência (%) das população de linfócitos B CD 19 <sup>+</sup> em amostras de sangue periférico dos grupos 1, 2 e 3
<b>Figura 23</b> - Mediana ± IQR da frequência (%) das populações de linfócitos B em amostras de sangue periférico dos grupos 1, 2 e 3. Linfócito B <i>naive</i> : CD19+CD27-; Linfócito B memória: CD19+CD27+; Linfócito B ativado: CD19+CD69+CD40+. *: diferença significativamente relevante quando comparado o grupo com os demais (p<0,05)
<b>Figura 24 –</b> Mediana ± IQR da frequência (%) do TLR-2 e TLR-4 em linfócitos B em amostras de sangue periférico dos grupos 1, 2 e 3. *: diferença significativamente relevante quando comparado o grupo com os demais (p < 0,05)
<b>Figura 25 –</b> Mediana ± IQR da frequência (%) do TLR-2 e TLR-4 em linfócitos B em amostras de sangue periférico de RN dos grupos 1, 2 e 3 conforme a gravidade clínica e positividade da cultura
<b>Figura 26 –</b> Regulação da IL-10 pelo TNF- $\alpha$ e endotoxinas. Fonte: Oberholzer et al., 2002

# **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Critérios diagnósticos para Sepse14
Tabela 2 - Critérios diagnósticos para Sepse Grave15
Tabela 3 - Marcadores de superfície celular de células dendríticas mielóides e         plasmocitóides
Tabela 4 - Marcadores de superfície celular de monócitos    19
<b>Tabela 5 -</b> Marcadores de superfície celular das subpopulações de linfócitos T naïve, linfócitos T de memória central e linfócitos T de memória efetora 20
Tabela 6 - Marcadores de superfície celular da subpopulação de linfócitos T         efetores
Tabela 7 - Marcadores de superfície celular das subpopulações de linfócitos B         naïve, linfócitos B ativados e linfócitos B de memória
Tabela 8 - Características demográficas dos 45 RN
Tabela 9 - Distribuição dos RN de acordo com as manifestações clínicas e         laboratoriais
Tabela 10 - Distribuição dos RN de acordo com o microrganismo isolado 28
Tabela 11 - Distribuição do grupo 1 de acordo com a apresentação clínica         inicial, desfecho e positividade da cultura em líquidos estéreis30
<b>Tabela 12 -</b> Dosagem de citocinas nas amostras de soro de RN com (Grupo 1) e sem infecção (Grupo 2). Mediana (P25-75) pg/mL
<b>Tabela 13 -</b> Mediana da frequência (%) $\pm$ IQR das populações de monócitos em amostras de sangue periférico dos recém-nascidos do grupo 1 (cultura positiva ou cultura negativa), grupo 2 e do grupo 3. $p$ referente à significância estatística na análise multivariada pelo teste de Kruskal-Wallis

#### **RESUMO**

Redondo ACC. Avaliação da resposta inflamatória e da resposta imune inata na célula apresentadora de antígeno em recém-nascidos de termo com sepse tardia [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: Apesar do contínuo progresso no tratamento e suporte clínico a sepse continua sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade nas unidades de terapia intensiva, com desfechos semelhantes ao longo dos últimos 50 anos. A suscetibilidade à infecção grave no recém-nascido é parcialmente devida à imaturidade do sistema imune inato associado à mínima em exposição antigênica in utero e à ação ineficaz das células T efetoras e das célula B. Embora a ativação do sistema imune inato por padrões de reconhecimento (PRR) como os dos receptores Toll-like (TLR) tenham sua importância amplamente reconhecida nos últimos anos, seu comportamento frente a uma infecção in vivo ainda não foi completamente compreendido. Neste trabalho nós analisamos a expressão dos TLR-2 e TLR-4 em células apresentadoras de antígeno em recém-nascidos com e sem sepse. CAUSUÍSTICA E MÉTODO: Trata-se de um estudo prospectivo realizado no período entre fevereiro de 2011 e janeiro de 2013 onde foram incluídos quarenta e cinco recém-nascidos a termo, sem malformação congênita, admitidos na Unidade de Cuidados Intensivos Neonatal do Instituto da Criança-HCFMUSP e divididos em grupos 1 e 2. O grupo 1 consistiu em 27 recémnascidos com diagnóstico clínico e laboratorial de sepse tardia enquanto que o grupo 2 foi composto por 18 recém-nascidos sem quadro séptico vigente. As citocinas foram determinadas por teste de CBA em sangue periférico. A expressão e MFI dos TLR-2 e TLR-4 foi determinado por imunofenotipagem em APCs e linfócitos no sangue periférico total através de análise pelo citômetro de fluxo BD FACSDiva. RESULTADOS: Os dados clínicos foram semelhantes entre os grupos 1 e 2, exceto para o estado infeccioso. Microrganismos foram identificados em 37 % no grupo 1 e estes tiveram níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL-6, IL-1β) e de citocina anti-inflamatória (IL-10). Nas células dendríticas, a expressão de TLR-2 e 4 foi semelhante entre os grupos enquanto que houve menor expressão nos pacientes infectados da molécula co-estimuladora CD86 (p <0,05) e expressão semelhante de CD1a e CD80 em relação aos RN não infectados. No monócito, o MFI para TLR-2 e a freqüência de expressão do TLR-4 foi maior no grupo 1 (p = 0,01). Apesar da frequência de linfócitos totais ter sido mais baixa no grupo 1 (p = 0,002), não foi observada diferença quanto as suas subpopulações exceto em relação a maior frequência de LT efetor no grupo infectado com menor expressão da molécula CD28. Houve maior frequência de LB ativados no grupo 1 enquanto que a população total e as demais subpopulações foram semelhantes em número, moléculas de ativação e na expressão dos TLR-2 e 4 em ambos os grupos. **CONCLUSÃO:** Este estudo analisou a resposta imune inata no recém-nascido com e sem sepse. As IL-6, IL-8 e IL-10 foram bons indicadores desta doença. Recém-nascidos sépticos, que dependem quase exclusivamente do sistema imune inato, apresentaram pouca resposta *in vivo* na ativação de células dendríticas e monócitos propiciando uma resposta imune deficiente e maior susceptibilidade à infecção.

**DESCRITORES**: 1.Sepse/imunologia 2.Imunidade inata 3.Recém-nascido 4.Receptor 2 toll-like 5.Receptor 4 toll-like 6.Infecções bacterianas 7.Fungos 8.Interleucinas/sangue 9.Células dendríticas 10.Monócitos 11.Estudos prospectivos 12.Citometria de fluxo

#### **ABSTRACT**

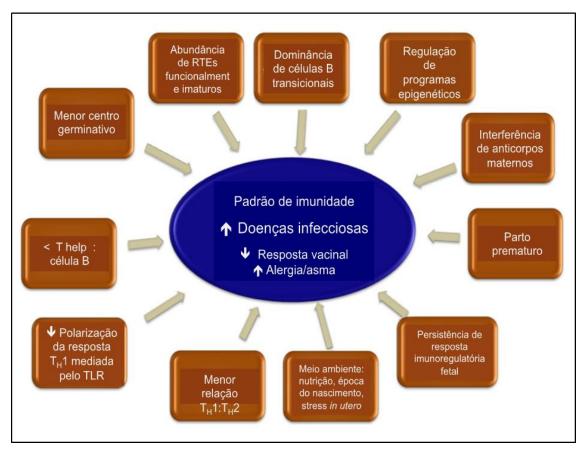
Redondo ACC. Inflammatory and innate immune response in antigenpresenting cell from term newborn with late onset sepsis [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

**INTRODUCTION:** Despite continuous progress in the clinical treatment and other supportive care therapies, sepsis remains a leading cause of morbidity and mortality in the intensive care unit with similar outcome throughout the past 50 years. The susceptibility to severe infection is partially due to newborn immature innate immune system associated to minimal in utero antigen exposure and effector T and B cell impaired function. Although the importance of pattern recognition domains such as Toll-like receptors (TLR) in the innate immune system activation has been fully acknowledged within the last few years its behavior in front of an in vivo infection scenario is still not completely understood. Here we analyzed the TLR-2 and TLR-4 expression in antigenpresenting cell in healthy and septic newborns. PATIENTS AND METHODS: This prospective study was conducted during the period from February 2011 until January 2013 at Sao Paulo University, Sao Paulo, Brazil. Forty-five term newborns without congenital malformation were included from the Newborn Intensive Care Unit at Children's Hospital. As group 1, 27 newborns who had clinical and laboratory diagnostic of late onset sepsis were included while 18 newborns were evaluated in a non-septic status and were included at group 2. Cytokines were measured by cytometric bead array in peripheral blood. TLR-2 and TLR-4 expression and MFI were determined by immunophenotyping at peripheral whole blood in APC cells and lymphocytes and analyzed on a BD FACSDiva flow cytometer. **RESULTS:** Clinical data was similar between septic and non-septic groups except for the infectious status. Group 1 had microorganisms identified in 37 % septic newborns associated with higher levels of pro-inflammatory (IL-8, IL-6, IL-1β) and anti-inflammatory interleukins (IL-10). When it comes to dendritic cells, the expression of TLR-2 and 4 was similar between groups whereas there was lower expression of co-molecule CD86 (p<0.05) and similar expression of CD1a and CD80 between infected and non-infected patients. At monocytes, the MFI for TLR-2 and the frequency of TLR-4 expression was higher in infected newborn (p=0,01). There were lower levels of total lymphocytes in infected patients (p=0,002) but no difference was observed in T cells subtypes frequency except for higher levels of effector T cell in infected group with lower expression of CD28 molecule. Group 1 had higher levels of activated B cell whereas total population and the other subsets were similar in number, activation molecules and TLR-2 and 4 expressions in both groups. **CONCLUSION:** This study investigated the innate immune response in septic and non-septic newborn. Interleukin levels 6, 8 and 10 were good indicators of sepsis. Septic newborns, which count most exclusively with innate immune system, had little *in vivo* response at dendritic cell and monocyte activation leading to an impaired immune response and increased susceptibility to infection.

**DESCRIPTORS**: 1.Sepsis/immunology 2.Immunity, innate 3.Infant, newborn 4.Toll-like receptor 2 5.Toll-like receptor 4 6.Bacterial infections 7.Fungi 8.Interleukins/blood 9.Dendritic cells 10.Monocytes 11.Prospective studies 12.Flow cytometry.



A sepse corresponde a uma das principais causas de morbidade e mortalidade no recém-nascido (RN) apesar dos avanços nos cuidados intensivos prestados. Acredita-se que a gravidade da evolução clínica se deva a vários fatores como demonstrado na figura 1 que atuam na interação existente entre o hospedeiro e seu agente agressor e, consequentemente, na ativação de uma cascata de eventos que irão formar a expressão da resposta imune.



**Figura 1** - Compreensão atual dos fatores que contribuem para o estado do sistema imunológico de uma criança. **Fonte:** Mercy PrabhuDas et al., 2011

A sepse neonatal apresenta dois padrões de doença com relação ao início da sintomatologia e os microrganismos envolvidos: início precoce, quando os sintomas se manifestam nas primeiras setenta de duas horas de vida, geralmente associada a complicações obstétricas com os microrganismos responsáveis aqueles do canal de parto e a sepse de início tardio, quando os sintomas se manifestam após 72h de vida, podendo ainda estar associados a complicações obstétricas, porém com intensidade bem menor em relação a de

início precoce e em relação aos microrganismos, ainda que possam ser adquiridos no canal de parto, na maioria são procedentes de contaminação pós-natal no berçário, através da equipe de saúde, equipamentos ou procedimentos invasivos.<sup>4,5</sup>

Os sinais e sintomas clínicos, tanto na sepse de início precoce como na de início tardio (após o terceiro dia de vida até três meses de idade), podem ser sutis e inespecíficos no começo da infecção, e muitas vezes mal interpretados ou confundidos com outras condições clínicas não infecciosas. Apesar disso, a sepse pode ter evolução fulminante, e levar a choque séptico, coagulação intravascular disseminada e óbito em poucas horas.<sup>6,7</sup>

A apresentação clínica do quadro infeccioso é assim classificada como sepse, sepse grave, choque séptico ou disfunção de múltiplos órgãos e sistemas a depender do grau de resposta inflamatória sistêmica e acometimento orgânico além da consequente necessidade de tratamento intensivo (reposição volêmica e/ou necessidade de drogas vasoativas).<sup>2,8,9</sup>

Diferentemente do adulto foram descritos no RN muitos graus de deficiência na resposta imune inata e adaptativa. Ao nascimento, a resposta imune adaptativa está prejudicada tanto pela mínima exposição antigênica intra-útero quanto pelo grau de função das células B e células T efetora. Por conta disso, o RN conta inicialmente com a efetividade da resposta imune inata e com a proteção passiva dos anticorpos maternos adquiridos via transplacentária. 11

A resposta imune inata é um mecanismo natural de defesa inicial que não necessita de exposição prévia aos patógenos e compreende mecanismos de barreira (pele e mucosas), celulares (neutrófilos, macrófagos, monócitos, células dendríticas, célula natural killer) e fatores humorais (complemento).

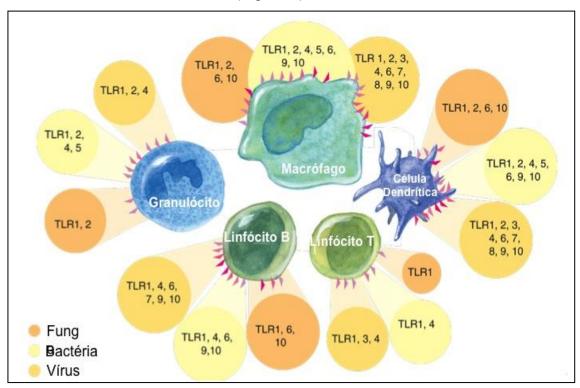
Todas as células da imunidade inata participam da defesa contra bactérias. Os macrófagos demonstram grande capacidade fagocítica; as células dendríticas processam eficientemente os patógenos e além de apresentarem os antígenos aos linfócitos T elas também são capazes de estimular células T naïve e de secretar citocinas com efeitos pleiotrópicos. 12

A defesa contra patógenos é, em parte, baseada na expressão de receptores com padrão de reconhecimento (PRRs) para estruturas específicas

do microorganismo, denominados de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs).<sup>13</sup>

Dentre os PRRs encontramos os receptores Toll-like (TLR). Inicialmente identificados em insetos do gênero *Drosophila* como participantes do desenvolvimento embriológico e função antimicrobiana, hoje tem-se relatado seu papel crucial como receptores sentinelas no reconhecimento de microorganismos patogênicos em praticamente todos os organismos. <sup>14,15</sup> Em mamíferos foram descritos 11 tipos de TLR que reconhecem diferentes PAMPs presentes em vírus, bactérias e fungos sendo sete com interação a microrganismos patogênicos. <sup>16,17</sup>

Os receptores Toll-like são expressos na superfície de monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos, células epiteliais ou no citoplasma de células de diferentes tecidos (Figura 2).



**Figura 2** – Padrão de expressão leucocitária dos TLR nos leucócitos e especificidade dos PAMPs. **Fonte:** Muzio, et al., 2000

Em humanos, dos 10 tipos de receptores descritos alguns se localizam na membrana plasmática (TLR-1, 2, 4, 5 e 6) e reconhecem lipídeos, lipoproteínas e proteínas não próprias (*nonself*), de modo que eles contém domínios intracelular, devido à presença de proteínas do tipo TIR (MyD88,

TIRAP, TRIF e TRAM) e extracelular (repetições ricas em leucina - LRR). Outros TLR (TLR-3, 7, 8 e 9) parecem estar localizados em compartimentos intracelulares onde reconhecem agentes patogênicos nucleares ou seja, nos endossomos e não possuem domínio extracelular.<sup>11,18</sup>

*In vivo*, a expressão do mRNA para o TLR-2 é observada em vários tecidos como o cérebro, coração, pulmão e baço mas seus maiores níveis encontram-se em células do sangue periférico enquanto que o mRNA do TLR-4 tem seus maiores níveis de expressão no baço e nas células do sangue periférico como células B, células dendrítricas (DCs), monócitos, macrófagos, granulócitos e células T conforme ilustrado na figura 2. <sup>19-23</sup>

A ativação de TLR presentes em células imunes induz a expressão de vários genes diretamente envolvidos na produção de citocinas inflamatórias em resposta à infecção. <sup>23,24</sup>

Estudos da literatura mostram que o TLR-2 funciona via ligação com TLR-1 e/ou 6. Assim o dímero TLR1-TLR2 reconhece os PAMPs de bactérias Gram positivas, incluindo lipoproteínas, lipopeptídeos, peptideoglicanos e o ácido lipoteicóico. A associação TLR2-TLR6 é responsável pelo reconhecimento do ácido lipoteicóico da parede de bactérias gram-positivas e do zimosan (componente de polissacarídeo derivado de fungos).<sup>25</sup>

Já os lipopolissacárides (LPS) presentes nas bactérias Gram negativas são reconhecidos basicamente pelo TLR-4 no complexo formado entre CD14/TLR-4/MD-2. 11,13,18,26 As interações entre o LPS e o complexo TLR-4 exercem influência fundamental na amplificação da resposta imune celular. Como pode ser observado na figura 3 este receptor possui uma porção intracitoplasmática que ativa sinais de transdução, recrutando várias proteínas intracelulares (MyD88, IRAK e TRAF-6), que vão desencadear a ativação das vias JNK e ERK da cascata das MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógeno). Essas proteínas estão envolvidas na ativação dos fatores de transcrição AP-1 (ativador proteico-1) e NF-kB (fator nuclear kappa B), o que favorece a expressão de genes relacionados à resposta inflamatória e microbicida. 17,28,29

Dessa forma, o estímulo de reconhecimento na membrana celular desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que promove a ativação

de fatores de transcrição (fator nuclear kB - NF-kB) e expressão de várias citocinas efetoras, por exemplo citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ , além de moléculas que auxiliam na estimulação, diferenciação e ativação de células T. Ainda, podem promover a produção de IL-10 em macrófagos ativados por LPS. Dessa maneira, percebe-se que a imunidade inata é um elemento chave na resposta inflamatória bem como na integração com a resposta imune adquirida frente aos patógenos.

CpG, ssRNA, flagelina

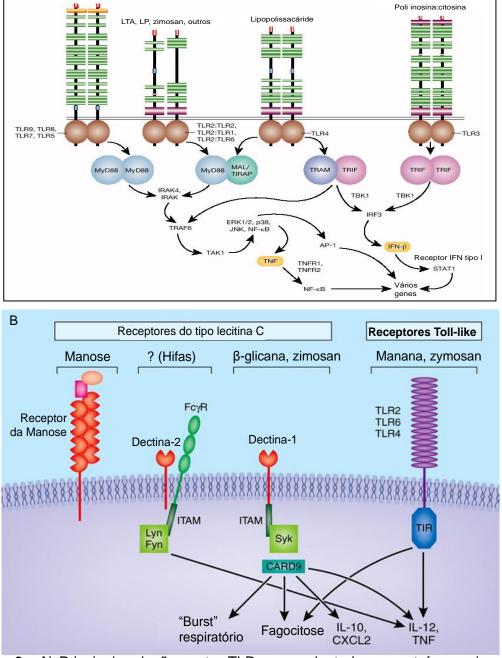
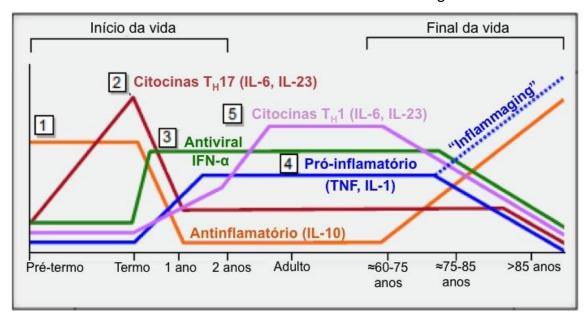


Figura 3 - A) Principais relações entre TLR, seus adaptadores, proteínas quinases e efeitos na sinalização intracelular; Fonte: Beutler, 2004 B) Principais formas de

detecção de componente de leveduras pelo hospedeiro. Fonte: Dostert et al., 2007

O equilíbrio existente entre a produção de citocinas pró e antiinflamatórias é fortemente regulada com o objetivo de permitir uma resposta imune eficiente e ao mesmo tempo de proteger o hospedeiro de uma resposta inflamatória excessiva.<sup>31</sup> O nascimento impõem grandes desafios na capacidade de regulação do sistema imunológico incluindo a prevenção de reações aloimunes prejudiciais a antígenos maternos intrauterino e permitindo o balanço na transição desse ambiente estéril para o mundo exterior rico em microrganismos.<sup>32</sup> Para enfrentar essas demandas, a resposta neonatal do TLR parece ser tendenciosa já que estimula uma menor produção de citocinas pró-inflamatórias além de achados demonstram que uma menor polifuncionalidade, isto é, células individuais nesta faixa etária têm menor capacidade de produzir múltiplas citocinas simultaneamente em resposta ao estímulo com agonistas do TLR.33 Os níveis séricos das citocinas se equiparam às do adulto com o decorrer da vida conforme ilustrado na figura 4.34



**Figura 4** - Mudanças dependentes da faixa etária no padrão de interleucinas após estímulo in vitro com agonistas do TLR. **Fonte:** Kollmann et al., 2012

A predominância do padrão de resposta TH17-like associado a produção considerável de IL-10 parece contribuir para uma diminuição da resposta T helper tipo 1 (TH1), resultando em maior susceptibilidade a infecções intracelulares e menor resposta vacinal durante a infância.<sup>34</sup>

No período neonatal têm-se descrito alterações quantitativas e qualitativas com relação aos receptores Toll-like e às células participantes da resposta imune inata quando comparadas ao indivíduo adulto, proporcionais a idade gestacional ao nascer.<sup>35</sup> Estas diferenças poderiam elucidar a maior susceptibilidade à infecção observada na faixa etária neonatal.<sup>1,36</sup>

Tal susceptibilidade do RN a invasão por patógenos está relacionada, em parte, a imaturidade funcional da resposta imune. Uma ativação eficiente dos linfócitos T neonatais requer a ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs), como células dendríticas, monócitos, macrófagos e linfócitos B, o qual envolveria a indução da expressão de moléculas co-estimuladoras, assim como a produção de diversas citocinas.

Monócitos neonatais exibem baixa expressão basal das moléculas que auxiliam na estimulação como o CD86 e CD40, a qual não é aumentada por potentes ativadores, como a combinação de IFN-γ e CD40L. Monócitos e macrófagos neonatais ainda produzem baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-1β ou IL-12, em resposta ao LPS bacteriano. Essas alterações provavelmente resultam em vias de sinalização ligadas ao TLR ineficientes, mas a natureza dessas deficiências ainda não está bem elucidada. Embora seja descrito que monócitos neonatais expressam mRNA para os diferentes TLR em níveis similares aos de monócitos de adultos, esses dados não excluem possíveis diferenças na expressão da proteína destes receptores.<sup>37</sup>

Uma das principais vias de ativação das APCs é desencadeada pela estimulação dos diversos receptores semelhantes ao TLR, já identificados. O LPS de bactérias Gram negativas, reconhecido pelo TLR-4 é um dos principais imunoestimuladores presentes na parede bacteriana que induz a ativação de proteínas intracelulares e a translocação de diferentes fatores de transcrição essenciais para a expressão dos genes e assim mediam a resposta inflamatória. Consequentemente, o TLR-4 tem papel crucial na indução da resposta imune inata e adquirida contra bactérias Gram negativas. Recentes estudos sugerem que a imaturidade do sistema imune adaptativo ao nascimento envolve alterações funcionais das APCs.

A principal função dos linfócitos T e B é de responder ao antígeno. A ligação dos antígenos a esses receptores produz sinais intracelulares que alteram o comportamento celular. A célula dendrítica que ingere o patógeno se ativa e isso faz com que a mesma amadureça e se transforme numa célula apresentadora de antígeno (APC) altamente efetiva e que sofre mudanças que permitem a ativação de linfócitos patógeno-específicos que se encontram nos linfonodos.<sup>38</sup>

Além das particularidades mencionadas sobre o sistema imune neonatal lembramos também que 40% dos RN têm opsonização deficiente por deficiência fisiológica na via clássica do complemento (C1q e C4); ausência de anticorpos específicos, via alternativa do complemento deficiente e baixo nível de C9. Além disso, os RN tem má opsonização às bactérias EGB e *E. coli* pois o ácido siálico da cápsula do polissacarídeo inibe o C3b. 39,40

A interação entre os sistemas imune inato e adaptativo pode estar comprometida no período neonatal, e embora a imaturidade do sistema imune adaptativo tenha sido bem descrita ao nascimento, recentes estudos sugerem que esta imaturidade envolva outras alterações, além da ativação de células T. Células apresentadoras de antígenos também exibem alterações funcionais que podem levar a deficiências secundárias nas respostas de células T adaptativas.<sup>41,42</sup>

Desta forma, embora defeitos na cascata de ativação de TLR estejam claramente presentes em monócitos e macrófagos neonatais, uma melhor definição desta deficiência e sua relevância *in vivo* ainda não foram bem esclarecidas, pois apesar destas vias de sinalização resultarem na ativação de NFκB e MAP-kinases, vias alternativas que levam a ativação destas moléculas também parecem existir e sua regulação e função em macrófagos e monócitos neonatais ainda não foram bem compreendidas.

Portanto, apesar da crescente conscientização sobre a importância do sistema do TLR na defesa do RN contra as infecções, <sup>32</sup> muito necessita ainda ser esclarecido sobre os mecanismos de regulação das respostas TLR no período neonatal.



#### 2.1 Gerais

Caracterizar o comportamento da resposta imune inata do recémnascido com sepse neonatal tardia causada por bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos e compará-lo com indivíduos sem infecção.

## 2.2 Específicos

Esperamos nos grupos estudados:

- Determinar os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-6,
   IL-8, IL-12 e IL-17A e das citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10.
- Quantificar em sangue periférico o número absoluto e frequência (em porcentagem) das diferentes populações celulares: células dendríticas mielóides e plasmocitóides, monócitos, linfócitos T e B.
- 3. Analisar a expressão através da frequência e intensidade média de fluorescência (MFI) dos receptores Toll-like 2 (TLR-2), frente a infecção por bactérias Gram positivas e fungos e do Toll-like 4 (TLR-4) frente a infecção por bactérias Gram negativas e fungos nas células leucocitárias do sangue periférico.

\_ 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelas Comissões de Ética em Pesquisa do Instituto da Criança e do Hospital Geral de Pirajussara e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq). O consentimento livre e esclarecido foi assinado pelos pais ou responsáveis legais antes da inclusão dos pacientes no estudo. (Anexo 1)

#### 3.1 Local do estudo

Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais (UCINE) do Instituto da Criança do HCFMUSP e o Berçário Anexo à Maternidade do Hospital Geral de Pirajussara no período de Fevereiro de 2011 a Janeiro de 2013.

#### 3.2 Critérios de inclusão

A população de estudo foi constituída por recém-nascidos a termo internados nas unidades de cuidados neonatais e classificados como Grupo 1 (n = 27) aqueles que apresentaram manifestações clínicas e/ou laboratoriais de sepse neonatal após 72h do nascimento (sepse tardia) e como Grupo 2 (n = 18) aqueles recém-nascidos que não apresentavam tais manifestações.

#### 3.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos os RN com diagnóstico de infecções congênitas, erros inatos do metabolismo (que por si só alterariam a resposta imunológica), uso de anti-inflamatórios (indometacina, ibuprofeno e corticoides), diagnóstico de hemorragia intracraniana comprovada por ultrassonografia ou tomografia computadorizada de crânio, procedimento cirúrgico na última semana e síndromes que possam comprometer o sistema imune além daqueles em que a ocasião da coleta não seria favorável à análise do material.

#### 3.4 Critérios clínicos de sepse

As definições de sepse, sepse grave, choque séptico e disfunção/falência de múltiplos órgãos e sistemas são semelhantes às do adulto mas dependem de valores de referência específicos para a idade quando se trata da frequência cardíaca, frequência respiratória e contagem de leucócitos.<sup>43,44</sup>

Para caracterização do quadro clínico foram utilizados os critérios citados no Surviving Sepsis Campaign (2012)<sup>45</sup> conforme exposto a seguir onde na população pediátrica o diagnóstico de sepse contemplou o seguinte:

Sinais e sintomas de inflamação associado a infecção com hipertermia ou hipotermia (temperatura retal > 38.5° ou < 35°C); taquicardia (> 2 desvios padrão do valor normal para a idade); associado a pelo menos 1 dos seguintes indicadores de função orgânica alterada: alteração do nível de consciência, hipoxemia, aumento do lactato sérico ou alteração do pulso.

Tabela 1 - Critérios diagnósticos para Sepse

#### Infecção, documentada ou suspeita, e algum dos seguintes:

#### Variáveis Gerais

Febre \* utilizado neste estudo temperatura axilar ≥ 37,8 °C

Hipotermia

Taquipnéia

Alteração no nível de consciência

Edema significativo ou balanço hídrico positivo (>20 mL/kg em 24h)

Hiperglicemia na ausência de diabetes (glicose plasmática > 140 mg/dL)

#### Variáveis Inflamatórias

#### \* valores ajustados para a faixa etária quando pertinente conforme item 3.5

Leucocitose

Leucopenia

Leucócitos normais mas com mais que 10 % de formas imaturas

PCR plasmático > 2 vezes o valor normal

Pró-calcitonina plasmática > 2 vezes o valor normal

#### Variáveis Hemodinâmicas

Hipotensão arterial (PAS ou PAD < 2 DP do normal para a idade)

#### Variáveis de Disfunção Orgânica

Hipoxemia arterial ( $PaO_2/FiO_2 < 300$ )

Tabela 1 - Critérios diagnósticos para Sepse "conclusão"

#### Infecção, documentada ou suspeita, e algum dos seguintes:

Oligúria aguda (débito urinário < 0,5 mL/kg/h por pelo menos 2 h apesar da ressuscitação hídrica adequada)

Aumento na creatinina > 0,5 mg/dL

Distúrbio de Coagulação (INR > 1,5 ou TTPa > 60 s)

Íleo (ausência de ruídos hidroaéreos)

Trombocitopenia (plaquetas < 100.000 μL<sup>-1</sup>)

Hiperbilirrubinemia (bilirrubina plasmática total > 4 mg/dL)

#### Variáveis de Perfusão Tecidual

Hiperlactatemia ( > 1mmol/L)

Tempo de enchimento capilar diminuído ou pele marmorata

FONTE: Surviving Sepsis Campaign (2012)

Conforme o mesmo consenso a definição de sepse grave ocorre conforme a Tabela 2 enquanto que choque séptico é definido como hipotensão induzida pela sepse apesar da ressuscitação hídrica adequada e que necessita de suporte cardiovascular com uso de drogas vasoativas.<sup>46</sup>

**Tabela 2 -** Critérios diagnósticos para Sepse Grave

Sepse grave = Hipoperfusão tecidual, hipotensão ou disfunção orgânica induzidos pela sepse (qualquer dos itens seguintes secundários a quadro infeccioso)

Hipotensão induzida pela sepse

Lactato acima do limite superior da normalidade

Débito urinário < 0,5 mL/kg/h por mais de 2 h apesar da reposição volêmica adequada

Lesão pulmonar aguda com PaO2/FiO2 < 250 na ausência de pneumonia como fonte de infecção

Lesão pulmonar aguda com PaO2/FiO2 < 200 na presença de pneumonia como fonte de infecção

Creatinina > 2,0 mg/dL

Bilirrubina > 2,0 mg/dL

Plaquetas < 100.000 μL

Coagulopatia (INR > 1,5)

FONTE: Surviving Sepsis Campaign (2012)

#### 3.5 Critérios laboratoriais gerais (Anexo 2)

Foram coletadas amostras de sangue, urina e líquor (LCR), dos pacientes do grupo de estudo e os critérios abaixo foram utilizados como sugestivos de infecção.

A. Score Hematológico de Rodwell<sup>47</sup>: Considera-se 1 ponto para cada parâmetro alterado do hemograma e um Score ≥ 3 é considerado como suspeito de infecção. Quando maior que 4 apresenta sensibilidade de 100% e especificidade de 60%.<sup>48</sup>

#### 1. Leucopenia ou Leucocitose

- Leucopenia ≤ 5.000

- Leucocitose ao nascimento: ≥ 25.000

12 a 24 h: ≥ 30.000

≥ 48 h: ≥ 21.000

#### 2. Neutropenia ou Neutrofilia

	Neutropenia		Neutrofilia		↑N	↑ <b>ι/</b> Τ
PN (g)	<1.500	>1.500	<1.500	>1.500	Imaturos	
Nascimento	<500	<1.800	>6.300	>5400	>1.100	>0,16
12h	<1.800	<7.800	>12.400	>14.500	>1.500	>0,16
24h	<2.200	<7.000	>14.000	>12.600	>1.280	>0,16
36h	<1.800	<5.400	>11.600	>10.600	>1.100	>0,15
48h	<1.100	<3.600	>9000	>8.500	>850	>0,13
60h	<1.100	<3.000	>6.000	>7.200	>6.000	>0,13
72h	<1.100	<1.800	>6.000	>7.000	>550	>0,13
120h	<1.100	<1.800	>6.000	>5.400	>500	>0,12
4-28d	<1.100	<1.800	>6.000	>5.400	>500	>0,12

PN= Peso ao nascimento; h= horas; d= dias; N= neutrófilos; 1

I/T= Aumento de neutrófilos imaturos /totais:

#### 3. Aumento de neutrófilos imaturos

- 4. Aumento de neutrófilos imaturos /totais
- 5. Neutrófilos imaturos/ neutrófilos segmentados >0,3
- 6. Alterações degenerativas aos neutrófilos com granulação tóxica ou vacuolização
- 7. Plaquetopenia: Plaquetas <150.000 /mm<sup>3</sup>
- B. Proteína C reativa (PCR): considerou-se este exame representativo de infecção quando ≥ 10 mg/L;
- C. Hemocultura: exame padrão ouro para o diagnóstico de sepse neonatal. Para pesquisa de bactérias e fungos foi coletado 1 mL de sangue por punção venosa periférica no dia da suspeita diagnóstica de sepse, antes da introdução de antibioticoterapia.
- D. Líquido cefalorraquidiano (LCR): colhido por punção lombar, no dia da suspeita diagnóstica de sepse, antes da introdução de antibioticoterapia.
   Consideraram-se como valores alterados os seguintes parâmetros<sup>49,50</sup>:
  - Celularidade maior que 20 leucócitos por mm³
  - Neutrófilos acima de 20 %
  - Proteínas acima de 100 mg% nos RN a Termo
  - Glicorraquia menor que 75 % da glicemia
  - Bacterioscopia positiva
  - Cultura positiva
- E. Cultura de urina: colhida por punção suprapúbica (PSP) ou sondagem vesical de alívio para pesquisa de bactérias e fungos no dia da suspeita diagnóstica de sepse.

Esses exames laboratoriais fazem parte da rotina para RN com suspeita de infecção e todos foram realizados no Laboratório Clínico do hospital de origem.

#### 3.6 Exames laboratoriais específicos

Dos pacientes incluídos (Grupo 1 e Grupo 2) coletou-se amostras de sangue por punção venosa de veia periférica e distribuiu-se 0,5 mL em tubo com gel separador para dosagem de citocinas e 1,5 mL em tubo com EDTA para realização de imunofenotipagem. Estes exames foram realizados no LIM 36 (Laboratório de Investigação Médica do Instituto da Criança do HC-FMUSP).

# 3.6.1 Caracterização dos leucócitos do sangue periférico por Imunofenotipagem

Para a realização da imunofenotipagem, as hemácias das amostras de sangue colhidas em tubo contendo EDTA foram lisadas com Lysing Buffer (BD Pharm LyseTM, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), incubadas à temperatura ambiente por 20 minutos e centrifugadas a 1800 rpm por 10 minutos a 10 °C, desprezando-se o sobrenadante. Após a repetição do procedimento descrito acima, foram realizadas 2 lavagens com Staining Buffer e centrifugação a 1800 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas no volume de Staining Buffer adequado para que em cada well da microplaca de 96 wells contivesse 1x10<sup>6</sup> células em 100 µL de Staining Buffer. Os anticorpos préestabelecidos (Tabelas 3 a 7) foram adicionados e a placa permaneceu incubada por 30 minutos a temperatura ambiente e na ausência de luz. Em seguida, foram adicionados 100 µL/well de Staining Buffer, a placa centrifugada a 1800 rpm por 5 minutos a 10 °C e o sobrenadante desprezado. Foram feitas 2 lavagens com Staining Buffer nas mesmas condições de centrifugação anterior. O sobrenadante foi desprezado e as células novamente suspensas em 300 µL de Staining Buffer e, então, transferidas para tubos de citometria. A leitura foi feita no citômetro de fluxo FACS LRS II Fortessa utilizando o software BD FACSDiva. As diferentes populações celulares foram captadas utilizandose como parâmetro o tamanho (forward scatter, FSC) e a granulosidade celular (side scatter, SSC). Para a captação de células dendríticas, especificamente, foram excluídas as populações de linfócitos, monócitos e neutrófilos. A análise

foi feita no software *FlowJo* (*Tree Star, Ashland, OR, USA*), onde cada população celular foi analisada separadamente através de *gates* utilizando como parâmetro o tamanho e a granulosidade celular. Pelo mesmo software obteve-se os dados apresentados que representam a Mediana da Intensidade de Fluorescência (MFI, *median fluorescence intensity*) dos respectivos marcadores.

Os números absolutos das populações foram calculados pela multiplicação entre a porcentagem indicada de cada população na citometria de fluxo e o número absoluto de leucócitos determinados pelo contador automático de células.

**Tabela 3 -** Marcadores de superfície celular de células dendríticas mielóides e plasmocitóides

piasinocito			
Anticorpo monoclonal	Clone	Fluorocromo	Fabricante
Lineage**	**	FITC	BD Biosciences
HLA-DR	G46-6	V500	BD Biosciences
CD11c	3.9	PE Cy5	BioLegend*
CD123	7G3	PE Cy7	BD Biosciences
CD1a	HI149	APC Cy7	BioLegend
CD80	2D10	APC	BioLegend
CD86	2331(FUN-1)	PE	BD Biosciences
TLR-2 (CD282)	11G7	Alexa 647	BD Biosciences
TLR-4 (CD284)	HTA 125	Brilliant Violet 421™	BioLegend

<sup>\*</sup>BioLegend Inc. (San Diego, CA, USA)

Tabela 4 - Marcadores de superfície celular de monócitos

Anticorpo monoclonal	Clone	Fluorocromo	Fabricante
HLA-DR	L243	APC Cy7	BD Biosciences
CD14	M5E2	Pacific blue	BD Biosciences

<sup>\*\*</sup> anti-CD3 (clone SK7), anti-CD14 (clone MΦP9), anti-CD16 (clone 3G8), anti-CD19 (clone SJ25C1), anti-CD20 (clone L27), anti-CD56 (clone NCAM16.2)

Tabela 4 - Marcadores de superfície celular de monócitos "conclusão"

Anticorpo monoclonal	Clone	Fluorocromo	Fabricante
CD80	BB1	FITC	BD Biosciences
CD86	2331(FUN-1)	PE Cy5	BD Biosciences
TLR-2 (CD282)	11G7	Alexa 647	BD Biosciences
TLR-4 (CD284)	HTA125	PE	BioLegend

**Tabela 5 -** Marcadores de superfície celular das subpopulações de linfócitos T naïve, linfócitos T de memória central e linfócitos T de memória efetora

Anticorpo monoclonal	Clone	Fluorocromo	Fabricante
CD3	SK7	APC Cy7	BD Biosciences
CD4	SK3	PerCP	BD Biosciences
CD27	M-T271	FITC	BD Biosciences
CD45RA	HI100	APC	BD Biosciences
CCR7	3D12	PE Cy7	BD Biosciences
CD62L	DREG-56	PE	BD Biosciences

**Tabela 6** - Marcadores de superfície celular da subpopulação de linfócitos T efetores

Anticorpo monoclonal	Clone	Fluorocromo	Fabricante
CD3	UCHT1	V450	BD Biosciences
CD4	SK3	APC Cy7	BD Biosciences
CD69	L78	PECy7	BD Biosciences
CD62L	DREG-56	PE	BD Biosciences
CD40L (CD154)	TRAP1	PE Cy5	BD Biosciences

<b>Tabela 7 - Marcadores de superfície celular das subpopulações de linfócitos B</b>
naïve, linfócitos B ativados e linfócitos B de memória

Anticorpo monoclonal	Clone	Fluorocromo	Fabricante
CD19	4G7	PerCP	BD Biosciences
CD27	M-T271	FITC	BD Biosciences
CD69	DREG-56	PECy7	BD Biosciences
CD40	5C3	PE	BD Biosciences
TLR-2 (CD282)	11G7	Alexa 647	BD Biosciences
TLR-4 (CD284)	HTA125	Brilliant Violet 421™	BioLegend*

# 3.6.2 Dosagem de citocinas nas amostras de soro de RN saudáveis e com sepse

Para auxiliar a identificação de amostras de RN a termo saudáveis ou que apresentassem uma possível infecção, em associação com os dados do prontuário e com os exames de rotina foram dosados os níveis basais das citocinas TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e IL17-A nas amostras de soro através do teste de CBA (Cytometric bead array BD OptEIA™ Set Human), de acordo com as instruções do fabricante.

No teste de CBA foram usados 50 µL das amostras de soro adicionadas a um *pool* de *beads* de captura específicas para todas as citocinas citadas. Também foi acrescentado o reagente de detecção conjugado a PE. Esses mesmos reagentes foram adicionados às diluições seriadas dos padrões das citocinas. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente e protegidos da luz, todos os tubos foram lavados e analisados por citômetro de fluxo, de acordo com a intensidade de fluorescência de cada *bead* de captura para cada citocina. Foram salvos 2.000 eventos em P1. As concentrações dessas citocinas nas amostras foram determinadas através da mediana de fluorescência e baseadas na curva padrão obtida para cada citocina. O limite de detecção para todas as citocinas foi 20 pg/mL.

#### 3.6.3 Amostras controle de sangue de adultos saudáveis

Foram obtidas amostras de sangue periférico de adultos saudáveis (denominado Grupo 3) que foram utilizadas para padronização e controle dos testes realizados. Os critérios de seleção foram: adultos voluntários saudáveis de 18 a 35 anos, dos sexos masculino e feminino, com reações sorológicas negativas para HIV, HTLV I/II, hepatites B e C, doença de Chagas e sífilis, e ausência de sintomas de infecção no período da coleta. As sorologias acima descritas foram coletadas nos RN quando houve suspeita de infecção congênita após confirmação das sorologias maternas pelo cartão de pré-natal materno.

#### 3.7 Análise Estatística

No presente trabalho, os dados dos RN foram registrados em formulário de coleta e armazenados em planilha eletrônica do pacote estatístico GraphPad-Prism versão 6.0c para Mac OS X, GraphPad Software, La Jolla California USA, (www.graphpad.com).

Para as variáveis qualitativas foi calculada a frequência absoluta e relativa (número de casos e porcentagem) enquanto que para as variáveis quantitativas foi calculada a média, o desvio padrão (DP), a mediana, os valores mínimo e máximo e intervalo interquartil (p25-p75), para cada um dos receptores avaliados em cada análise.

Além da análise estatística descritiva foram utilizados: Teste de Mann-Whitney (para análise realizada entre diferentes grupos); Teste de Kruskal-Wallis (para análise comparativa das medianas de mais de 2 grupos) com pósteste de Dunn objetivando identificar de quais grupos de dados eram diferentes entre si.

Os testes foram realizados com limites de intervalo de confiança de 95%, e um valor de p<0,05 foi considerado significativo.

#### 3.8 Delineamento do estudo

## População de Estudo

 $\downarrow \downarrow$ 

#### 45 RN que preenchiam os critérios de inclusão

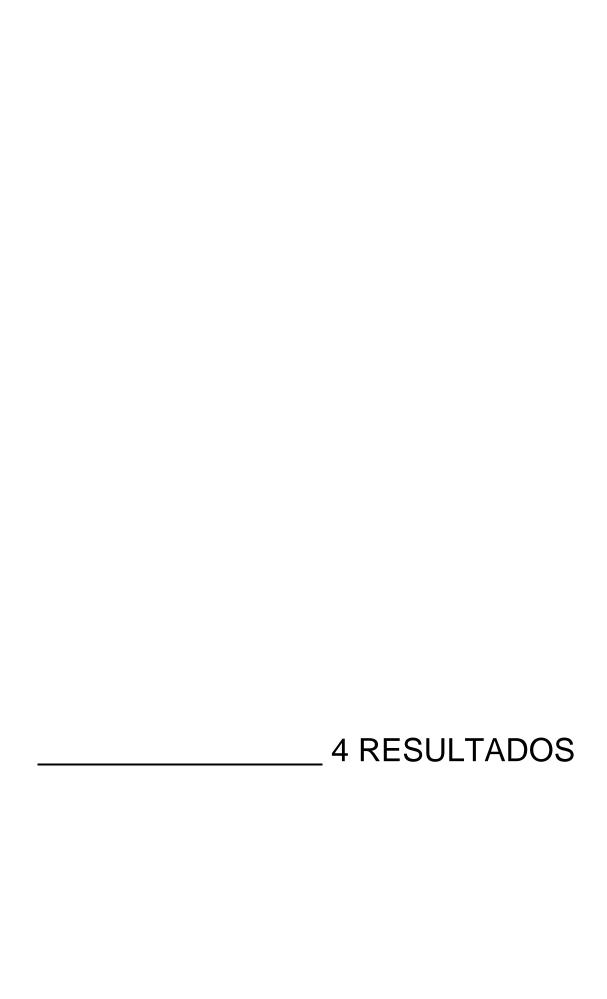
Critérios de inclusão

RN com diagnóstico de sepse neonatal Tardia ou Muito Tardia RN sem sinais clínicos e laboratoriais compatíveis com infecção

- Critérios de Exclusão: situações que alteram a resposta imunológica
  - ⇒ infecções congênitas
  - ⇒ erros inatos do metabolismo
  - ⇒ uso de anti-inflamatórios (indometacina, ibuprofeno e corticoides)
  - ⇒ diagnóstico de hemorragia intracraniana comprovada por USG ou TC de crânio
  - ⇒ procedimento cirúrgico na última semana
- 45 RN preencheram os critérios de inclusão e exclusão consistiam em:

Grupo 1 (27 RN com infecção) Grupo 2 (18 RN sem infecção)

- Evolução do quadro infeccioso
- Sepse /Sepse Grave /Choque Séptico (DMOS)
- Alta hospitalar
- Exames específicos: citocinas, PCR, avaliação das populações celulares e expressão dos receptores Toll-like 2 e 4 em células dendríticas mielóides e plasmocitóides, monócitos, linfócitos T e B.



# 4.1 Análise dos dados demográficos e caracterização dos Grupos 1 e 2

Foram incluídos 45 recém-nascidos cujas características demográficas encontram-se expostas na tabela 8.

Tabela 8 - Características demográficas dos 45 RN

Variáveis	Grupo 1 (N=27)	Grupo 2 (N=18)	p
Idade na Internação (dias)		·	
Mediana (P25-P75)	11 (2-22)	4,5 (0-12,7)	0,044
Mínimo-Máximo	0-93	0-34	
Idade de Início dos sintomas (dias)			
Mediana (P25-P75)	20 (8-29)	-	-
Mínimo-Máximo	2-92		
Idade na Coleta (dias)			
Mediana (P25-P75)	21 (12-30)	12,5 (7-17)	0,003
Mínimo-Máximo	3-93	2-35	
Peso de Admissão (gramas)			
Mediana	3130	3168	0,195
(P25-P75)	(2823-3511)	(2953-3588)	
Mínimo-Máximo	2200-3885	2755-3695	
Gênero [N (%)]			
Masculino	14 (51,8)	6 (33,4)	-
Feminino	13 (48,1)	12 (66,6)	

N= número absoluto; P25-75 = percentil 25 – percentil 75.

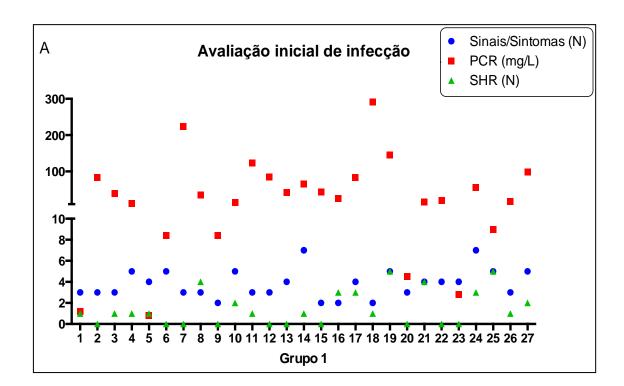
O quadro infeccioso foi determinado como diagnóstico inicial que justificou a internação ou quando foi adquirido durante a permanência no setor.

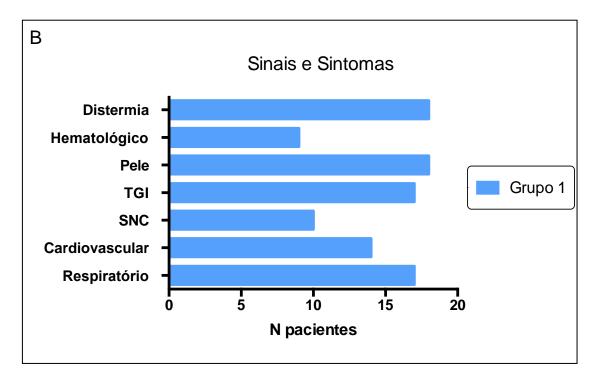
Dentre os 27 pacientes com infecção, 23 apresentaram pelo menos três critérios clínicos e/ou laboratoriais compatíveis com quadro infeccioso e caracterizados anteriormente na metodologia. Quatro paciente apresentaram dois critérios clínicos mas com SHR/PCR de respectivamente: 0/8,4; 4/35,2;

3/25,6 e 1/291. Os critérios clínicos mais frequentes foram a distermia e alterações na pele e subcutâneo conforme exposto na figura 5 e tabela 9.

Observa-se ainda que a avaliação laboratorial inicial de processo infeccioso/inflamatório (Score de Rodwell ou PCR) mostrou-se condizente com a hipótese diagnóstica de infecção no grupo 1 mas não no grupo 2. Dos pacientes do grupo 1 analisados 7 apresentaram SHR ≥ 3, 14 apresentaram SHR entre 0 e 2 mas com PCR alterado com valores entre 11,2 a 291 mg/L e 6 apesar das manifestações clínicas compatíveis com infecção só evoluíram com alteração do SHR e/ou PCR após 24h de evolução clínica (Figura 5). Associado ao quadro clínico foi possível caracterizar a todos os 27 pacientes desse grupo como portadores de um quadro infeccioso vigente.

No grupo 2 houve a coleta de hemograma completo, PCR e hemocultura em alguns pacientes devido a rotina do serviço no momento da internação. O mesmo não aconteceu quando a coleta do sangue foi feita durante a internação visando exclusivamente a análise das citocinas séricas e imunofenotipagem.





**Figura 5 - A)** Distribuição dos RN do grupo 1 conforme o número de sistemas com sinais e/ou sintomas de infecção, PCR e SHR. **B)** Número total de pacientes com determinado sinal e/ou sintoma para cada sistema. N= número; TGI= trato gastrointestinal, SNC= sistema nervoso central.

**Tabela 9 -** Distribuição dos RN de acordo com as manifestações clínicas e laboratoriais

Variáveis	Grupo 1	Grupo 2	p
Sinais e Sintomas			
N de pacientes/sintomas-N (%)			
Respiratórias	17 (16,5 %)	0	-
Cardiovasculares	14 (13,6 %)	0	
SNC	10 (9,7 %)	0	
Gastrointestinais	17 (16,5 %)	0	
Pele e subcutâneo	18 (17,4 %)	0	
Hematológicas	9 (8,7 %)	0	
Instabilidade Térmica	18 (17,4 %)	0	
Score de Rodwell (SHR)			
Mediana (IQR)	1 (0-3)	0 (0-0)	0,0004
Mínimo-máximo	0-5	0-1	

**Tabela 9 -** Distribuição dos RN de acordo com as manifestações clínicas e laboratoriais "conclusão"

Variáveis	Grupo 1	Grupo 2	p
PCR (mg/L)			
Mediana (IQR)	35,2 (9-83,1)	1,25 (0-4)	<0,0001
Mínimo-máximo	0,8-291	0-26,3	

N=número absoluto; IQR (intervalo interquartil)

Em muitos casos, as culturas coletadas não isolaram nenhum agente etiológico, mas de acordo com os sinais clínicos e outros exames laboratoriais a sepse clínica ficou comprovada.

A identificação do microrganismo em líquidos estéreis (sangue, urina, LCR) ocorreu em 10 pacientes do grupo 1 (37 %), sendo observado mais de um agente em 2 pacientes. No grupo 2 todas as culturas quando colhidas tiveram resultado negativo conforme o esperado. A distribuição dos RN de acordo com o microrganismo isolado e local de identificação (bactérias Grampositivas, bactérias Gram-negativas e fungos) encontra-se descrita na Tabela 10.

Em conformidade ao quadro clínico vigente foram coletadas amostras de cultura de secreção conjuntival e nasofaringe para esclarecimento diagnóstico em três pacientes. A positividade dessas culturas não foi determinante para o diagnóstico e/ou tratamento de sepse nos pacientes em questão. Esses pacientes apresentaram quadro clínico compatível com sepse (N=2) ou sepse grave (N=1) com pneumonia e necessidade de suporte ventilatório invasivo. Os exames laboratoriais iniciais desses pacientes incluíram SHR de 0 a 4 e PCR de 15,5 a 85,5 mg/L.

**Tabela 10 -** Distribuição dos RN de acordo com o microrganismo isolado

Culturas	Gru	ро 1	Grup	00 2
Guitarao	N	%	N	%
Líquidos estéreis				
Hemocultura periférica	8	30,7	0	0
Staphilococcus epidermidis				
Staphilococcus aureus				

**Tabela 10 -** Distribuição dos RN de acordo com o microrganismo isolado "conclusão"

Culturas	Gru	ро 1	Grup	00 2
Guitaras	N	%	N	%
Enterobacter cloacae				
Salmonella sp				
Escherichia coli				
Candida parapsilosis				
Urocultura	3	11,5	0	0
Klebsiella pneumoniae				
Escherichia coli				
Líquor	0	0	0	0
Líquidos não estéreis				
Cultura de secreção conjuntival	3	11,5	0	0
Staphilococos epidermidis				
S. coagulase negativo				
Haemophilus influenzae				
Nasofaringe				
Bordetella pertussis	1	3,8	0	0
Culturas negativas	14	42,3	18	100
Total	29	100	18	100

N=número absoluto de pacientes

A evolução clínica dos 27 RN do grupo 1 ocorreu na forma de sepse sem complicações em 10 pacientes, sepse grave em 12 pacientes e choque séptico em 5 pacientes sendo que dos 3 óbitos observados, dois foram decorrentes do quadro infeccioso vigente e outro, constatado num paciente com sepse sem complicações, ocorreu posteriormente devido a outro quadro infeccioso na mesma internação.

Os dois óbitos decorrentes dos processos infecciosos vigentes ocorreram após 24 h e 48 h de evolução clínica com presença de bacilos Gram negativos em bacterioscópico de líquido ascítico (não confirmado em cultura) e *E. coli* em hemocultura periférica e urocultura respectivamente.

A positividade da cultura em líquidos estéreis foi constatada em 20 %, 50 % e 40 % respectivamente de acordo com a apresentação clínica do quadro infeccioso (Tabela 11).

**Tabela 11 -** Distribuição do grupo 1 de acordo com a apresentação clínica inicial, desfecho e positividade da cultura em líquidos estéreis

A	Alta hospitalar		Óbito		Cultura positiva		Cultura negativa	
Apresentação clínica	N	%	N	%	N	%	N	%
Sepse	9	90	1	10	2	20	8	80
Sepse Grave	12	100	0	0	6	50	6	50
Choque Séptico	3	60	2	40	2	40	3	60

N= Número absoluto

#### 4.2 Citocinas séricas

O comportamento das citocinas foi determinado através da dosagem de seus níveis nas amostras de soro de RN com quadro clínico infeccioso (Grupo 1) no momento inicial do diagnóstico e introdução da antibioticoterapia (primeiras 24 h) e também nos RN do Grupo 2 (Tabela 12).

**Tabela 12 -** Dosagem de citocinas nas amostras de soro de RN com (Grupo 1) e sem infecção (Grupo 2). Mediana (P25-75) pg/mL

Citocina (pg/mL)	Grupo 1	Grupo 2	p	
IL-8	134,0	34,9	-0.0001*	
IL-0	(75,2-351,4)	(19,6-70,3)	<0,0001*	
IL-6	100,0	3,9	<0,0001*	
IL-0	(31,2-323,6)	(1,9-10,8)	<0,0001	
IL-12p70	1,95	0,7	0,319	
1Ε-12β/0	(0,2-3,8)	(0,4-1,6)	0,319	
II 40	2,5	1,0	0,004*	
IL-1β	(1,1-7,0)	(0,3-1,4)	0,004	

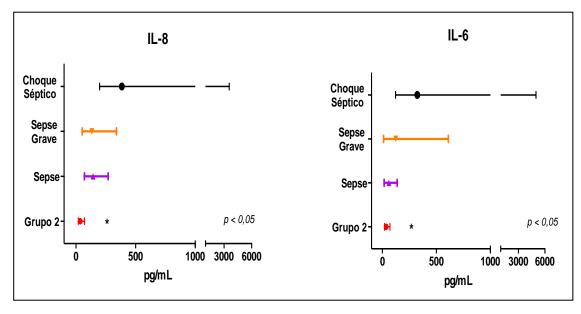
**Tabela 12 -** Dosagem de citocinas nas amostras de soro de RN com (Grupo 1) e sem infecção (Grupo 2). Mediana (P25-75) pg/mL "conclusão"

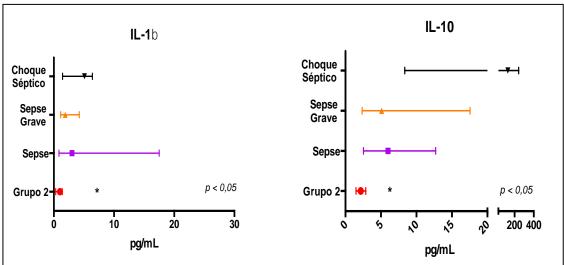
Citocina (pg/mL)	Grupo 1	Grupo 2	р
IL-10	6,7	2,1	0,0008*
.2 .0	(2,5-22,6)	(1,4-2,8)	0,000
TNF-α	1,5	0,75	0,080
της-α	(0,7-2,0)	(0,3-1,4)	0,000
IL-17A	48,3	11,2	0,111
IL-1/A	(26,6-111,3)	(7,7-51,4)	0,111
IL-2	0,25	0,95	0,692
IL-Z	(0-1,7)	(0,3-2,9)	0,092
IL-4	1,1	1,0	0,557
IL-4	(0,4-2.3)	(0,3-1,8)	0,337

Pode-se observar na tabela acima uma maior concentração de citocinas pró (IL-8, IL-6, IL1 $\beta$ ) e anti-inflamatórias (IL-10) no grupo 1 (p<0,05) quando comparado ao grupo 2 enquanto que a concentração da IL-4 (promotora da diferenciação da resposta  $T_H2$ ), IL-2 atuante na homeostase do sistema imune intestinal, IL-17A e TNF- $\alpha$  foi semelhante nos dois grupos.

Quando submetidos a análise das citocinas conforme a gravidade clínica os pacientes com quadro infeccioso foram subdivididos conforme referido anteriormente em sepse (N=8), sepse grave (N=12) e choque séptico (N=4).

A avaliação nesses pacientes dos níveis das citocinas pró e antiinflamatórias pode ser observada na figura 3. Nesta figura observa-se o mesmo padrão visto na Tabela 12 em que o nível sérico da IL-8, IL-6, IL1β e IL-10 foi significantemente menor nos pacientes do grupo 2 quando comparados aos pacientes com infecção independentemente da gravidade clínica. Não houve diferença entre os subgrupos com infecção para os níveis de interleucinas avaliadas.





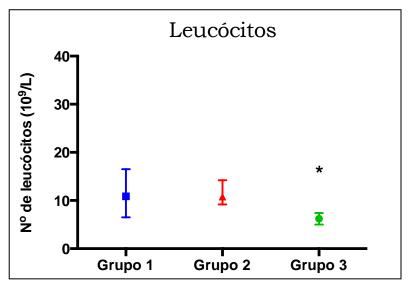
**Figura 6 -** Dosagem das citocinas no soro de RN dos grupos 2, Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico no dia do diagnóstico clínico. Mediana (P25-75)

# 4.3 Caracterização dos leucócitos presentes no sangue periférico por Imunofenotipagem

Tendo em vista a necessidade de padronização dos testes de imunofenotipagem com sangue de indivíduos adultos optamos por expor esses resultados juntamente com aqueles encontrados em RN já que pareceu interessante fazer a comparação com a situação basal de atividade de um sistema imune globalmente desenvolvido em situações de saúde e melhor

caracterizado na literatura. Assim, a partir de agora será incluído o grupo 3 referente aos resultados encontrados em adultos.

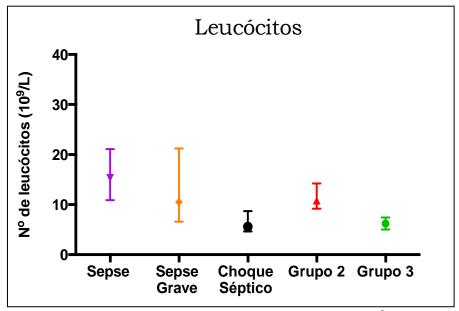
Conforme observado na figura 7, houve diferença estatística entre o número total de leucócitos encontrados no sangue periférico no grupo 3 com os dois grupos de RN (grupos 1 e 2) indicando um menor número de leucócitos totais em adultos conforme já descrito na literatura (p<0,0001). O número de leucócitos totais foi semelhante entre os grupos 1 e 2 (p=0,832).



**Figura 7 -** Mediana  $\pm$  IQR da contagem de leucócitos totais ( $10^9$  /L) nas amostras de sangue periférico.

Quando se avaliou o número de leucócitos nos subgrupos clínicos de sepse (Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico) observamos pela análise multivaridada diferença entre os subgrupos (p=0,0267). Assim observa-se que quanto maior a gravidade clínica maior tendência a leucopenia.

Já os pacientes com Choque Séptico apresentaram número de leucócitos semelhante ao de indivíduos adultos saudáveis (p = 0,724) e significativamente menor que os RN sem infecção (p = 0,0048). Os pacientes com Sepse e Sepse Grave apresentaram maior número de leucócitos em relação ao indivíduo adulto (p  $\leq$  0,0001) mas não houve diferença relativamente aos RN sem infecção (p = 0,308) (Figura 5).



**Figura 8 -** Mediana  $\pm$  IQR da contagem de leucócitos totais (10 $^9$ /L) nas amostras de sangue periférico de RN dos grupos 1 (Sepse, Sepse Grave, Choque Séptico), 2 e 3

A partir na população de leucócitos totais identificou-se as suas subpopulações através do uso de marcadores de superfície e de ativação celular e análise por citometria de fluxo. Conforme observado na figura abaixo pode-se perceber que as subpopulações de leucócitos apresentam dispersão característica conforme a granulosidade (*side scatter*, SSC) e tamanho (*forward scatter*, FSC) celular.

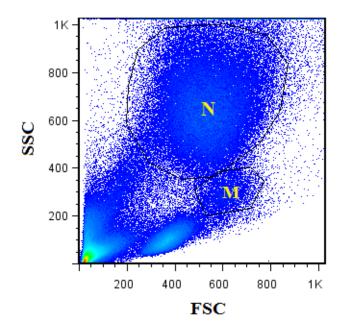


Figura 9 - Gate realizado nas populações de neutrófilos (N) e monócitos (M) tendo como parâmetro o tamanho (forward scatter, FSC) e granulosidade celular (side scatter, SSC)

Analisaremos a seguir as populações celulares na seguinte sequência: as células participantes do sistema imune inato (células dendríticas e monócitos) e em seguida células participantes do sistema imune adaptativo (linfócitos T e linfócitos B).

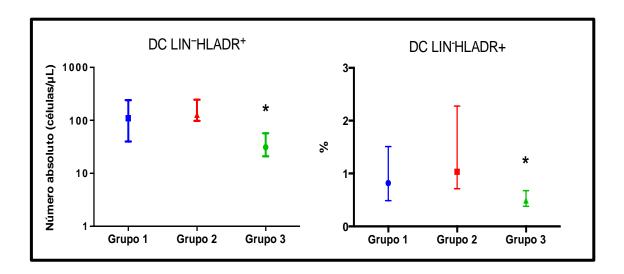
Os sistemas imune inato e adaptativo não são independentes entre si e agem em conjunto na tentativa de estabelecer uma resposta imune ao agente agressor de forma rápida, eficiente e duradoura. Dessa maneira, avaliar as células participantes desses dois sistemas se mostra importante no sentido de estudar direta e indiretamente a ativação e eficácia da resposta imune inata.

### 4.4 Caracterização das células dendríticas (DCs)

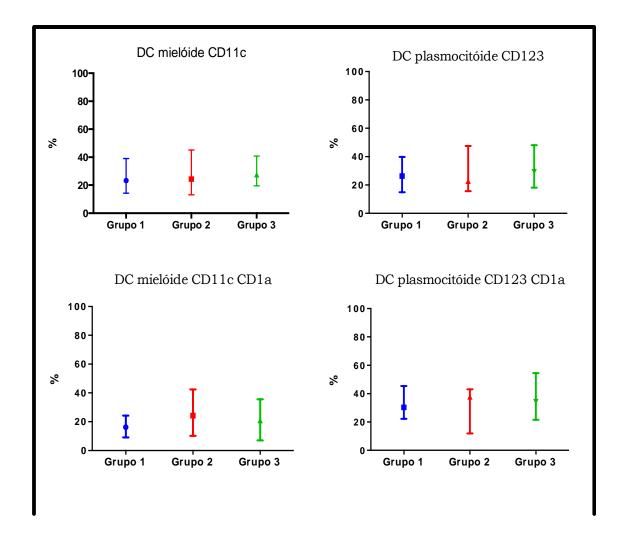
A população de DCs nas amostras de sangue periférico de adulto e de RN foi definida como LIN-HLADR+, de acordo com Koumbi et al. (2010), caracterizando populações mielóide (LIN-HLADR+CD11c+) e plasmocitóide (LIN-HLADR+CD123+) como descrito por Sorg et al. (1999) e Schreibelt et al (2010). As marcações foram feitas no mesmo tubo analisando marcadores de superfície, de maturação e de ativação celular (CD80 e CD86). Os resultados podem ser vistos na figura 4. 51-53

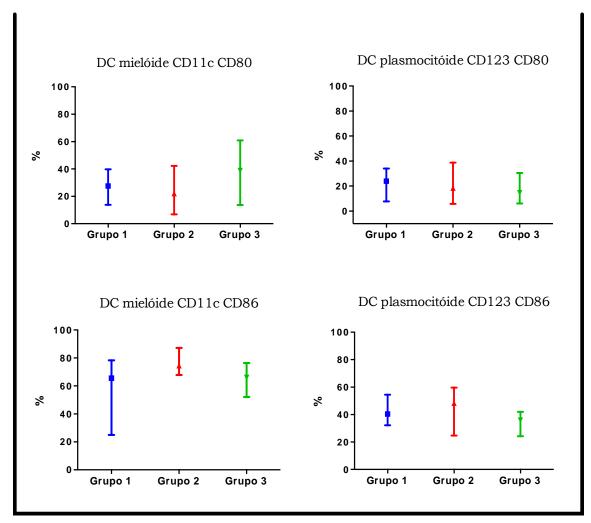
Observa-se um maior número absoluto e frequência de células dendríticas totais (LIN HLADR<sup>+</sup>) nos RN do grupo 1 e 2 quando comparado ao grupo 3 (p = 0,0079 e p < 0,0001 respectivamente) apesar da baixa frequência global vista em todos os grupos. A mediana da frequência variou de 0,49 a 1,03 % dos leucócitos totais. Mesmo com essa diferença, a resposta quantitativa da ativação das DCs mielóides e plasmocitóides totais (DC CD11c e DC CD123) e imaturas (DC CD11c CD1a e DC CD123 CD1a) foi semelhante em todos os grupos (Figura 10).

Na análise do nosso grupo amostral percebemos que a expressão das moléculas co-estimuladora CD80 e CD86 nas DC mielóide e plamocitóide foi semelhante entre os grupos 1, 2 e 3.







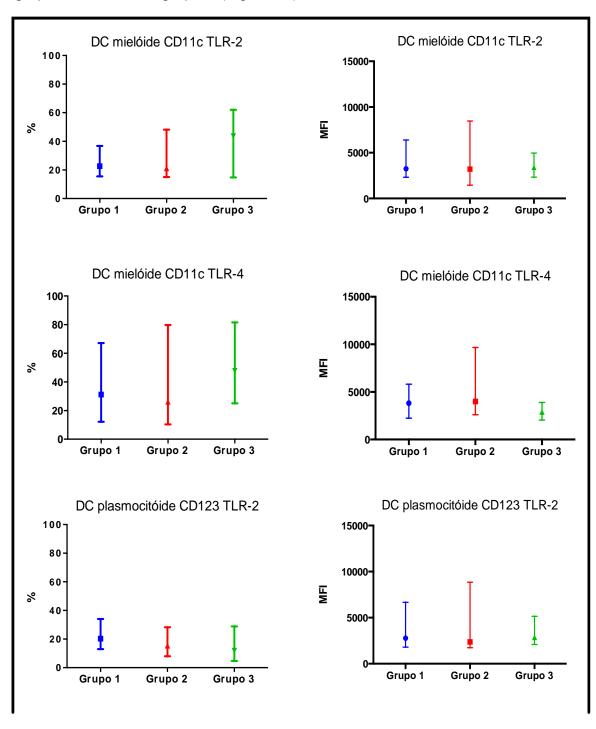


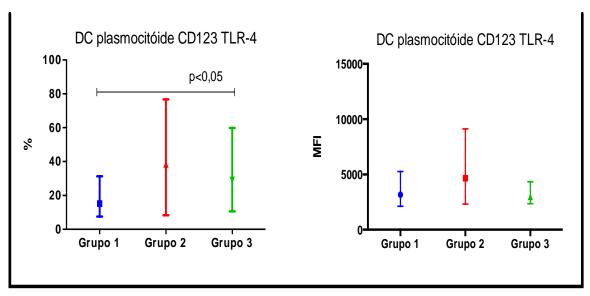
**Figura 10** - Mediana  $\pm$  IQR da frequência (%) das populações de células dendríticas totais (Lin-HLADR+); células dendríticas mielóides (CD11c) e plasmocitóides (CD123) totais; imaturas (CD1a); e que expressam os marcadores de ativação CD80 e CD86 em amostras de sangue periférico dos grupos 1, 2 e 3. DC: célula dendrítica. \* = valor significativamente menor quando comparado ao grupo 2 e 3.

A avaliação da frequência da expressão dos receptores Toll-like 2 e 4 encontra-se exposta na figura 11 e mostra não haver diferença significativa entre os grupos analisados através da análise estatística uni ou multivariada exceto pela menor frequência do TLR-4 em DC plasmocitóide no grupo 1 com relação ao grupo 3 (p = 0,047). Da mesma maneira a avaliação da intensidade de fluorescência média para os TLR-2 e TLR-4 foi semelhante nos mesmos subgrupos.

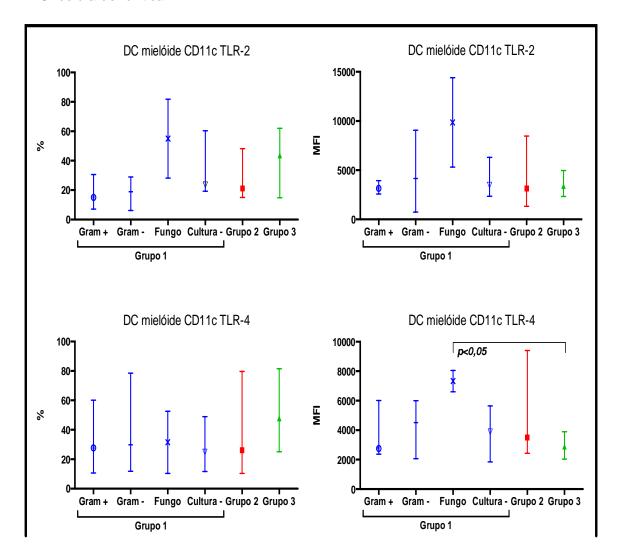
Quando o grupo sepse foi dividido conforme a positividade ou não da cultura e seus subgrupos de agentes (Gram-positivos, Gram-negativos e Fungos) observa-se que a frequência de expressão do TLR-2 e do TLR-4 foi

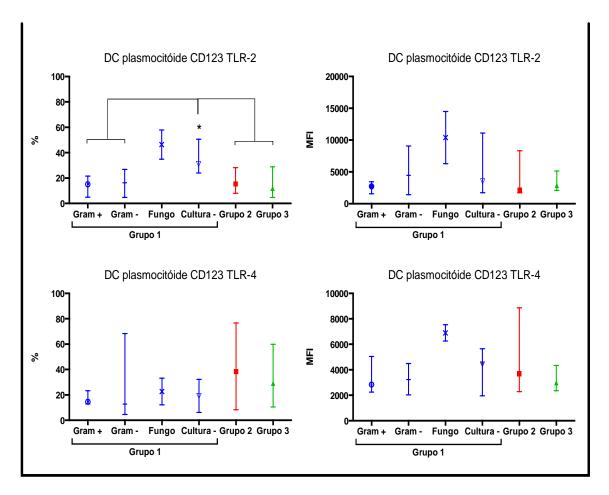
semelhante em todos os subgrupos exceto quando se comparou os pacientes com cultura negativa nas DC plasmocitóides com os demais subgrupos. A frequência de expressão desses receptores foi maior que em todos os outros subgrupos exceto naqueles que apresentaram fungo isolado em cultura. O mesmo não se observou quanto ao MFI. Ainda, houve maior MFI em DC mielóides de RN com infecção fúngica quando comparado aos indivíduos do grupo 3 mas não do grupo 2 (Figura 12).





**Figura 11** - Mediana  $\pm$  IQR da frequência (%) e MFI das populações de células dendríticas mielóides (CD11c) e plasmocitóides (CD123) que expressam os marcadores dos TLR-2 e TLR-4 em amostras de sangue periférico nos grupos 1, 2 e 3. DC: célula dendrítica.





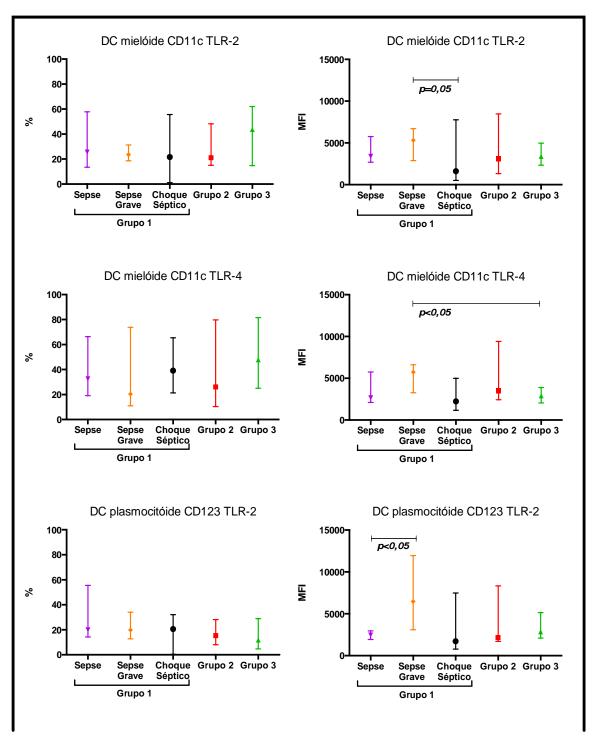
**Figura 12** - Avaliação do TLR-2 e do TLR-4 através da mediana  $\pm$  IQR da frequência (%) e MFI nas populações de células dendríticas mielóides (CD11c) e plasmocitóides em amostras de sangue periférico dos grupos 1 com cultura positiva para bactérias Gram positivas (Gram +), bactérias Gram negativas (Gram -), Fungos e com cultura negativa (Cultura -); Grupo 2 e Grupo 3.

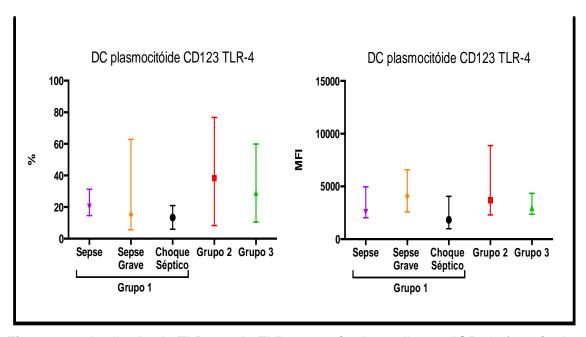
Ao se analisar a frequência da expressão dos TLR 2 e 4 nas DC mielóides e plasmocitóides observamos que não houve diferença entre os subgrupos clínicos de infecção (sepse, sepse grave e choque séptico) comparados aos grupo 2 e 3, diferentemente do encontrado na figura 11 onde houve uma menor frequência de TLR-4 nas DC plasmocitóides do grupo 1 comparativamente ao grupo 2.

Com relação à avaliação do MFI do TLR-2 e TLR-4 frente à gravidade clínica dos RN com infecção constatou-se que houve menor MFI do TLR-2 nas DC mielóides nos pacientes com Choque Séptico em relação aos que se apresentaram com Sepse Grave (p = 0,05) e, nas DC plasmocitóides, o MFI

para TLR-2 foi maior nos pacientes com Sepse Grave em relação aos com Sepse (p = 0,031) conforme figura 13.

O TLR-4 apresentou maior MFI nas DC mielóides de pacientes com Sepse Grave comparados a indivíduos do grupo 3 (p = 0,0093). Enquanto isso, a análise estatística entre os demais grupos não mostrou diferença significativa.





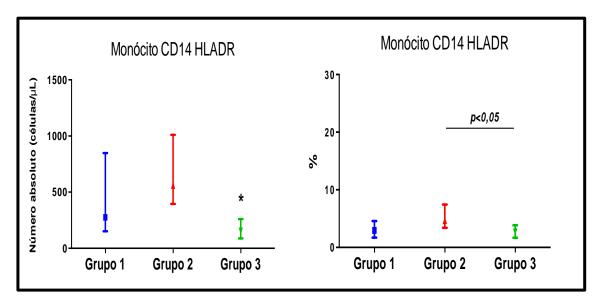
**Figura 13** - Avaliação do TLR-2 e do TLR-4 através da mediana  $\pm$  IQR da frequência (%) e MFI nas populações de células dendríticas mielóides (CD11c) e plasmocitóides em amostras de sangue periférico dos grupos 1 com Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico, grupo 2 e grupo 3.

#### 4.5 Caracterização dos monócitos

A população de monócitos foi definida pelo *gate* de células CD14<sup>+</sup>HLA<sup>-</sup> DR<sup>+</sup> utilizando como parâmetro o tamanho (forward scatter, FSC) e a granulosidade celular (side scatter, SSC) como descrito na literatura.<sup>54</sup>

A seguir observamos o número absoluto e a frequência de monócitos totais nos grupos 1, 2 e 3.

Podemos observar que a população absoluta total de monócitos é maior nos RN comparado aos adultos independentemente do quadro infeccioso (p < 0,0001) enquanto que há uma maior proporção da população de monócitos no sangue periférico de recém-nascidos de termo saudáveis comparativamente ao encontrado no sangue periférico de adultos (p = 0,0016) (Figura 14).

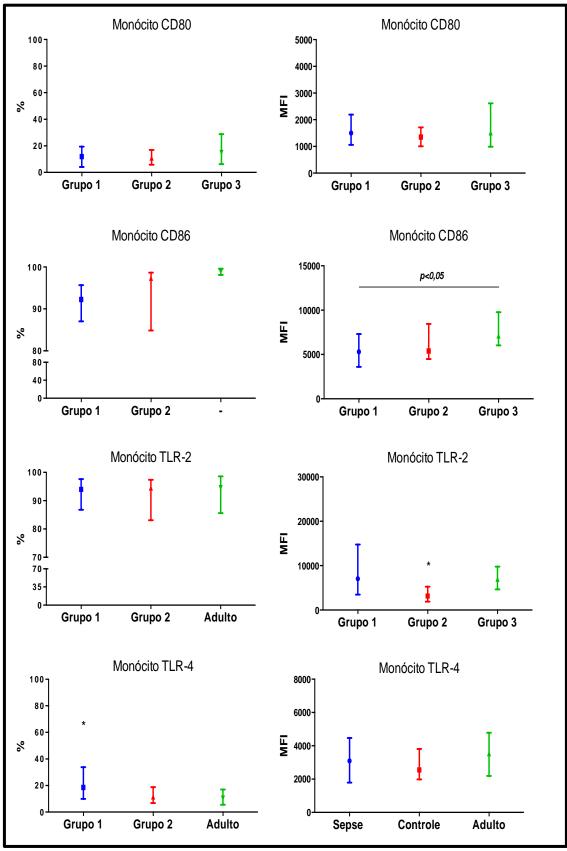


**Figura 14** - Mediana  $\pm$  IQR do número absoluto (células/ $\mu$ L) e frequência (%) de monócitos em amostras de sangue periférico nos grupos 1, 2 e 3.

Não houve alteração na frequência de monócitos ativados frente a um estímulo infeccioso no RN (p = 0,097). Assim, apesar do RN saudável ter proporcionalmente mais monócitos que o adulto, o percentual de monócitos ativados numa situação basal bem como frente a um estímulo infeccioso permaneceu o mesmo. Já o MFI nos monócitos que expressam a molécula coestimulatória CD86 foi menor em RN infectados quando comparado aos adultos (p = 0,0108) sugerindo um menor potencial de ativação da APC no RN.

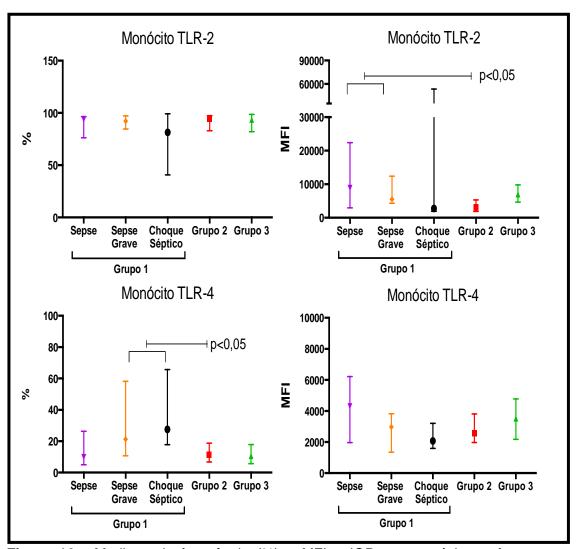
Apesar da frequência da expressão de TLR-2 ser semelhante nos três grupos observa-se um maior MFI em RN com quadro infeccioso quando comparado aos RN saudáveis (p = 0,0102) indicando que frente a uma infecção a expressão do receptor em cada célula aumenta.

De modo inverso, com relação aos TLR-4 a frequência na expressão desse receptor, ou seja, a porcentagem de monócitos que expressam o TLR-4 em sua membrana foi maior nos RN com infecção (grupo 1) quando comparado aos RN do grupo 2 (p = 0.0344) e adultos (p = 0.0043) mas o MFI não teve mudança significativa (p = 0.2349) (Figura 15).



**Figura 15 -** Mediana  $\pm$  IQR da frequência (%) e MFI da população de monócitos e dos marcadores de ativação CD80 e CD86, e dos receptores TLR-2 e 4 em amostras de sangue periférico dos grupo 1, 2 e 3.

Frente à gravidade do quadro clínico observamos maior MFI para TLR-2 em monócitos de pacientes com sepse e sepse grave quando comparado aos RN sem infecção (grupo 2) com p = 0,050 e p = 0,009 respectivamente. Apesar disso a frequência de expressão desse receptor na mesma população celular foi semelhante em todos os subgrupos. Em contrapartida, ocorreu maior frequência na expressão do TLR-4 em monócito de pacientes com sepse grave e choque séptico quando comparado aos RN sem infecção (grupo 2) com p = 0,0194 e p = 0,03 respectivamente. Apesar disso, diferentemente com o TLR-2, o MFI para o TLR-4 foi semelhante em todos os subgrupos (Figura 15).



**Figura 16 -** Mediana da frequência (%) e MFI  $\pm$  IQR em monócitos referente aos receptores TLR-2 e 4 em amostras de sangue periférico dos grupo 1, 2 e 3

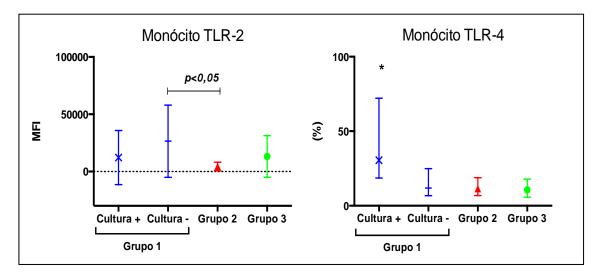
A presença de cultura positiva ou negativa não alterou de forma estatisticamente significativa o MFI ou a frequência da expressão das moléculas de ativação do monócito para o TLR-2 pela análise uni ou multivariada com relação aos grupos controle (RN ou adulto) bem como o tipo de agente isolado. O oposto foi observado na expressão do TLR-4 nos monócitos de pacientes com infecção em relação ao controle onde os pacientes com cultura positiva tiveram maior frequência do TLR-4 comparativamente ao Grupo 2, 3 e ao pacientes com cultura negativa (Tabela 11 e Figura 16).

**Tabela 13 -** Mediana da frequência (%) ± IQR das populações de monócitos em amostras de sangue periférico dos recém-nascidos do grupo 1 (cultura positiva ou cultura negativa), grupo 2 e do grupo 3. *p* referente à significância estatística na análise multivariada pelo teste de Kruskal-Wallis

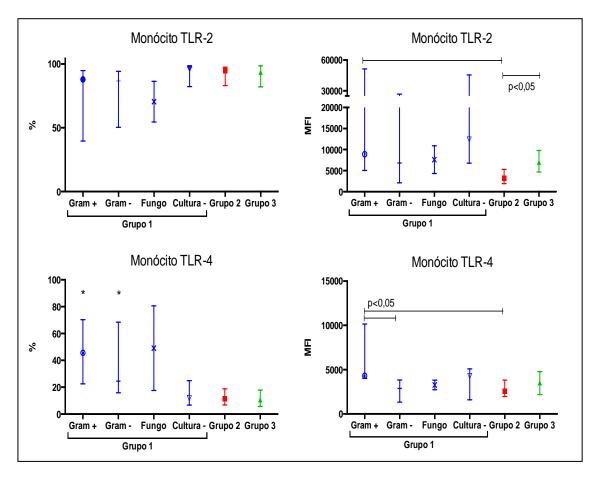
Monócitos (	Grupo 3	Grupo 2	Cultura negativa	Cultura positiva	р
[N] Mediana (p25-p75)					
TLR-2 <sup>†</sup>	[39] 93,5 (82-98,5)	[16] 94,4	[12] 96,5	[12] 87,1	0,475
		(83,1-97,3)	(82,2-97,6)	(59-92,2)	0,470
TLR-4 <sup>+</sup>	[39] 10,6	[16] 11,4	[12] 11,8	[11] 30,5	0,0011*
	(5,7-17,9)	(6,8-18,7)	(6,7-24,9)	(18,5-72,1)	0,0011

No entanto, observou-se nos pacientes com infecção e cultura negativa um maior MFI para o TLR-2 quando comparado aos RN sem infecção. Já com relação ao TLR-4, os RN com infecção e cultura positiva apresentaram maior frequência de células com o receptor em questão quando comparados aos RN controle e adultos (Figura 17).

Ao se subdividir os pacientes conforme o agente isolado observamos, de forma semelhante aos pacientes com cultura negativa, ocorreu maior MFI para o TLR-2 nos pacientes infectados por bactérias Gram-positivas comparativamente aos pacientes dos grupos 2 e 3 (Figura 18).



**Figura 17** - Mediana  $\pm$  IQR do MFI do TLR-2 e da frequência do TLR-4 em monócitos de sangue periférico de RN dos grupos 1 com cultura positiva (bactéria Gram positiva, bactéria Gram negativa), grupo 1 com cultura negativa e de sangue periférico dos grupos 2 e 3.

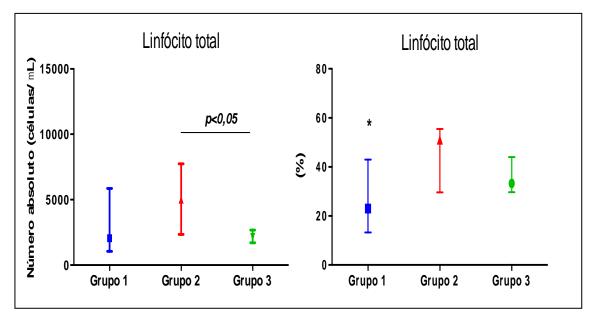


**Figura 18 -** Mediana  $\pm$  IQR da frequência e do MFI do TLR-2 e 4 em monócitos de sangue periférico de RN dos grupos 1 com cultura positiva (bactéria Gram positiva, bactéria Gram negativa), com cultura negativa e de sangue periférico dos grupos 2 e 3.

Quanto ao TLR-4 observamos que contrariamente ao esperado houve maior frequência e MFI desse receptor nos pacientes com infecção por bactérias Gram-positivas. Houve maior frequência comparativamente aos pacientes dos grupos 2, 3 e com cultura negativa enquanto que na análise do MFI essa diferença foi encontrada apenas em relação aos pacientes dos grupos 2 e 3 e naqueles infectados por bactérias Gram-negativas. Apesar da frequência do TLR-4 nos monócitos ter sido aumentada também nos pacientes com infecção por bactérias Gram-negativas em relação aos grupos 2 e 3, o MFI permaneceu semelhante.

#### 4.6 Caracterização dos linfócitos T (LT)

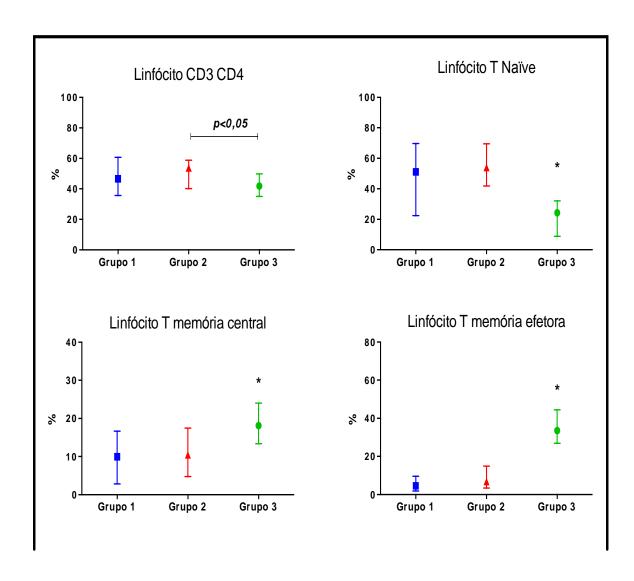
A frequência de linfócitos totais foi semelhante entre os RN saudáveis e adultos e mostrou-se diminuído nos RN com infecção (p = 0,0026) enquanto que o número absoluto de linfócitos totais foi maior no grupo 2 comparativamente ao grupo 3 (p = 0,0002) (Figura 19).

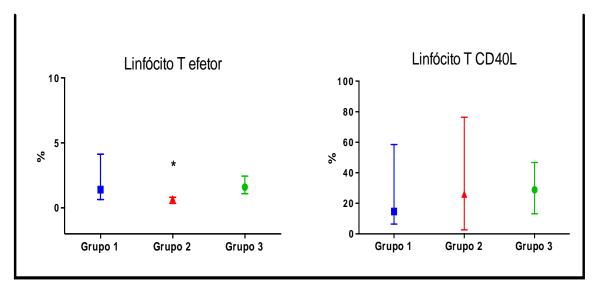


**Figura 19 -** Mediana  $\pm$  IQR do número absoluto (células/ $\mu$ L) e da frequência (%) da população de linfócitos T total em amostras de sangue periférico dos grupos 1, 2 e 3.

Já as diferentes populações de linfócitos T foram caracterizadas com base no conjunto de marcadores citados por Tanel e col. (2009) e estão expostas na figura abaixo.<sup>55</sup>

Conforme observado no primeiro gráfico da Figura 20 a mediana da frequência de linfócitos T CD4 foi de 46,6 %, 53,7 % e 41,9 % nos 1, 2 e 3 respectivamente. Os RN sem infecção apresentaram maior proporção de LT CD4 comparativamente aos adultos (p = 0,0182). No entanto, não houve diferença estatisticamente significante na frequência dos LT CD4 totais entre os grupos quando submetidos a análise multivariada. Observa-se no RN comparativamente ao adulto uma maior frequência de LT *naive* e uma menor frequência das populações de LT de memória central e memória efetora. A frequência da expressão do CD40 no LT foi semelhante nos 3 grupos.

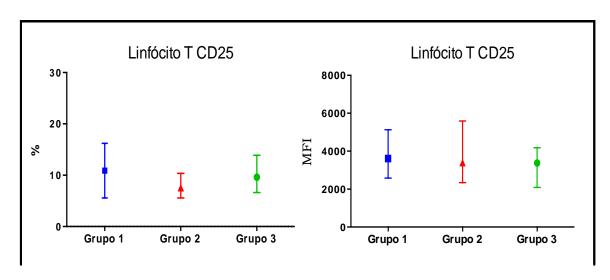


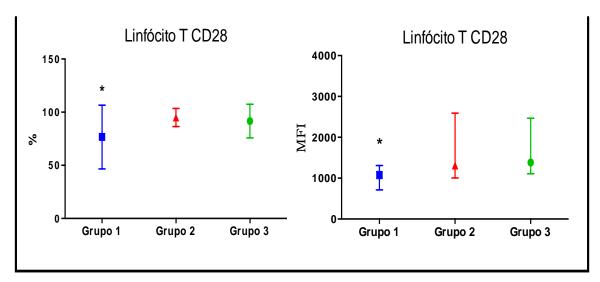


**Figura 20 -** Mediana  $\pm$  IQR da frequência (%) das populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em amostras de sangue periférico dos grupos 1, 2 e 3. T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>: Linfócito T; LT *naive*: CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>; LT efetor: CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>CD69<sup>+</sup>; LT memória central: CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>; LT memória efetora: CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD27.

Não houve diferença significativa entre os grupos 1 e 2 na frequência de nenhuma das subpopulações de LT analisadas excetuando-se a frequência do LT efetor que se mostrou aumentado no grupo 1 em relação ao grupo 2.

A expressão das moléculas CD28 e CD25 pelo LT encontra-se exposta na figura abaixo. Nos RN com infecção (Grupo 1) houve menor frequência na expressão do CD28 e na intensidade de fluorescência (MFI) comparativamente aos RN controle e adultos. Não houve diferença entre os grupos com relação ao LT CD25.



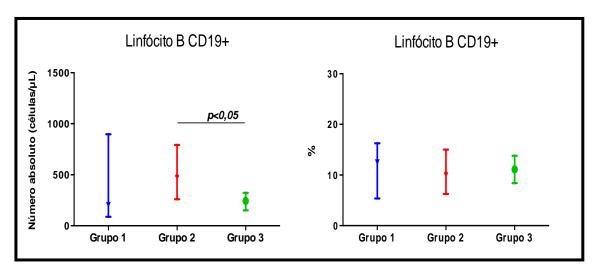


**Figura 21 -** Mediana  $\pm$  IQR da frequência (%), MFI e DP das populações de linfócitos T CD4 $^+$  CD28 e CD25 em amostras de sangue periférico dos grupos 1, 2 e 3.

A expressão dos TLR-2 e 4 não foi testada nesta população celular.

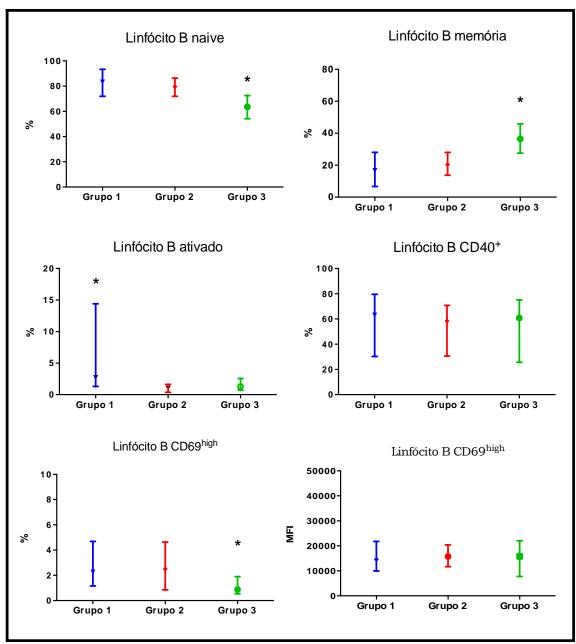
# 4.7 Caracterização dos linfócitos B (LB)

Conforme exposto na figura abaixo observamos que apesar dos RN sem infecção apresentarem proporcionalmente maior número absoluto de LB que os indivíduos do grupo 3, a frequência de LB total (LB CD19<sup>+</sup>) foi semelhante nos três grupos.



**Figura 22 -** Mediana  $\pm$  IQR do número absoluto (células/ $\mu$ L) e da frequência (%) das população de linfócitos B CD 19 $^{+}$  em amostras de sangue periférico dos grupos 1, 2 e 3.

Percebe-se na figura 23 que assim como na avaliação de linfócitos T a frequência de células B *naïve* foi significativamente maior nos RN com e sem infecção em relação ao grupo 3 (p < 0,0001) enquanto que de forma oposta a frequência de linfócitos B de memória foi maior no grupo 3 comparativamente aos pacientes dos grupo 1 e 2 (p < 0,0001).

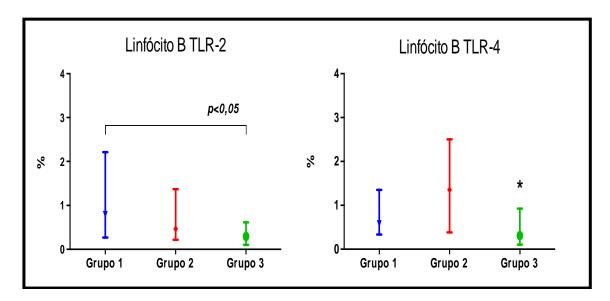


**Figura 23** - Mediana  $\pm$  IQR da frequência (%) das populações de linfócitos B em amostras de sangue periférico dos grupos 1, 2 e 3. Linfócito B naive: CD19+CD27-; Linfócito B memória: CD19+CD27+; Linfócito B ativado: CD19+CD69+CD40+. \*: diferença significativamente relevante quando comparado o grupo com os demais (p<0,05).

Em relação ao LB ativado observamos na mesma figura anterior que ocorreu maior frequência nos RN do grupo 1 comparativamente aos grupos 2 e 3 apesar de globalmente os três grupos mostrarem uma frequência baixa deste tipo celular. A frequência da expressão da proteína co-estimuladora CD40 no LB foi semelhante nos 3 grupos enquanto que houve maior frequência de LB CD69high nos pacientes dos grupos 1 e 2.

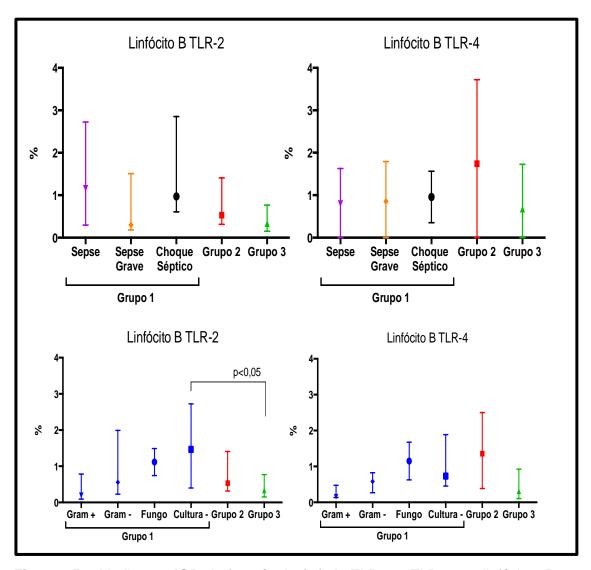
Quanto à expressão do TLR-4, podemos observar números muito reduzidos de células B expressando esses marcadores em suas membranas. A frequência encontrada apresentou mediana de 1,35 % nos recém-nascidos sem infecção, 0,59 % nos recém-nascidos com infecção e 0,31 % em adultos saudáveis. Apesar da frequência ter sido significativamente maior nos grupos 1 e 2 em relação ao grupo 3 (p = 0,0179 e p = 0,0084 respectivamente) pôde-se observar que os grupos 1 e 2 foram semelhantes (p = 0,156).

A frequência de expressão dos TLR-2 nos LB foi maior no grupo 1 em relação ao grupo 3 (p = 0,0187) enquanto que a expressão detectada através do MFI para o TLR-2 e 4, por ter sido muito baixa, não foi incluída nos resultados (Figura 24).



**Figura 24 –** Mediana  $\pm$  IQR da frequência (%) do TLR-2 e TLR-4 em linfócitos B em amostras de sangue periférico dos grupos 1, 2 e 3. \*: diferença significativamente relevante quando comparado o grupo com os demais (p < 0,05).

A gravidade clínica e a positividade da cultura não alteraram de forma estatisticamente significativa a frequência da expressão dos TLR-2 e 4 nos três grupos como exposto na figura 25. Apenas observamos que quando não houve agente isolado na cultura ocorreu maior frequência na expressão dos receptores TLR-2 com relação ao grupo 3 (p = 0,0168).



**Figura 25 –** Mediana  $\pm$  IQR da frequência (%) do TLR-2 e TLR-4 em linfócitos B em amostras de sangue periférico de RN dos grupos 1, 2 e 3 conforme a gravidade clínica e positividade da cultura.

5 DISCUSSÃO

A imaturidade da resposta imune no recém-nascido é alvo de investigação devido à importante repercussão sobre a mortalidade neonatal e consequentemente sobre a mortalidade infantil. A elevada mortalidade nesta faixa etária encontra-se diretamente relacionada à menor idade gestacional ao nascimento mas mesmo em recém-nascidos de termo o impacto gerado é significativo a ponto de instigar medidas de metas globais através das Nações Unidas com o objetivo inicial de redução em dois terços na mortalidade infantil até o ano de 2015.<sup>3,56</sup>

A resposta imune como previamente descrita inicia-se no reconhecimento entre o patógeno e as células do sistema imune inato com efeitos na diferenciação celular e produção de citocinas. Apesar da grande interação existente, por questões de praticidade, os resultados expostos serão discutidos separadamente com as devidas correlações conforme necessário.

#### 5.1 Citocinas

As citocinas são produtos do reconhecimento dos patógenos por receptores de padrão de reconhecimento (PRRs) cujo principal grupo é representado pelos TLR.

Assim como a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias é responsável pela amplificação da resposta de defesa do organismo e regulação da mesma, um segundo efeito importante diz respeito ao observado após a estimulação. Padrões de polarização na produção de citocinas (Th1, Th2 e Th17) podem promover a diferenciação das células T CD4+ naïve em subtipos distintos de células Th cujo papel é de clearance do patógeno.

Trabalhos observam a polarização da resposta inflamatória no recémnascido a termo através de uma grande produção de IL-6 e IL-23 em sangue periférico após estímulo *in vitro* com agonistas do TLR. Essa resposta oscila conforme a faixa etária estudada e alcança níveis semelhantes ao indivíduo adulto ao redor de 1 ano de idade.<sup>34</sup>

Nos recém-nascidos analisados observou-se maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1β, IL-8) e anti-inflamatórias (IL-10)

naqueles com quadro infeccioso vigente quando comparados aos recémnascidos sem infecção (Tabela 12).

## 5.1.1 Citocinas pró-inflamatórias

Conforme mencionado anteriormente o padrão de produção das citocinas após o estímulo dos TLR tem sido caracterizado em detalhes em todas as faixas etárias (Figura 3). Sabe-se, por exemplo, que após a estimulação *in vitro* dos TLR do sangue total de recém-nascidos a termo ocorre predomínio de citocinas IL-6 e IL-23 produzidas para manter a resposta TH17. Nesta casuística observamos apenas que dentre os RN do grupo 1 ocorreu elevação significativa na produção de IL-6 frente a um estímulo infeccioso *in vivo*. A IL-23 não foi objeto de estudo.

A IL-6 é considerada um importante marcador da resposta inflamatória sistêmica alcançando picos rápidos de concentração sérica após o estímulo e assim é reconhecida como uma citocina de alarme da infecção.<sup>57</sup>

Trabalhos descrevem que os níveis de IL-6 estão significativamente elevados nos RN com sepse  $^{58}$  e são sustentados por tempo maior que o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , refletindo a intensidade da resposta inflamatória.

O TNF- $\alpha$  é considerado um mediador do choque séptico por achados em modelos experimentais e por evidências na prevenção da endotoxemia e bacteremia quando neutralizado. Apesar de trabalhos mostrarem que o processo infeccioso desencadeado pela exposição ao LPS resulta na elevação do TNF- $\alpha$  durante os primeiros 30 a 90 minutos com pico entre 3 a 4 horas e tem boa correlação clínica também descreveu-se que nos pacientes com sepse e sepse grave o pico de produção dessa citocina não se correlaciona com a progressão lenta dessas apresentações clínicas. Neste trabalho, o comportamento de elevação da IL-6 pôde ser visto nos pacientes com infecção avaliados mas diferentemente do relatado na literatura não se observou diferença entre os níveis séricos de TNF- $\alpha$  nos grupos sepse grave e choque séptico.

Na maioria dos casos de sepse neonatal, a IL-6 aumenta rapidamente mas diminui dentro de 24 horas para níveis indetectáveis. Dessa maneira

podemos obter valores variados (falso-negativos) das citocinas próinflamatórias a depender do momento da coleta frente ao início do processo infeccioso como observado nos casos 2, 17 e 25 do grupo 1. (Anexo 5)

A meia-vida curta é decorrente da ligação da IL-6 a proteínas plasmáticas com a α<sub>2</sub>-macroglobulina, *clearance* precoce no fígado e inibição por outras citocinas. A IL-6 é um marcador bem precoce entretanto os níveis de PCR no plasma se tornam melhores indicativos de infecção após 12 a 48 horas do início do quadro, em um momento que os níveis de IL-6 provavelmente já decaíram. A dosagem combinada destes dois marcadores apresenta uma sensibilidade alta em crianças infectadas em qualquer período pós-natal.<sup>60</sup>

Os níveis de IL-1β aumentaram significativamente naqueles com infecção de maior gravidade clínica (sepse grave e choque séptico) comparativamente aos pacientes sem infecção o que difere do descrito na literatura onde há relatos de baixa produção desta interleucina por macrófagos neonatais (Tabela 12 e Figura 6). Na maioria dos trabalhos publicados a IL-1β raramente é detectada devido a rápida ação de seu potente inibidor, a IL-1Ra.

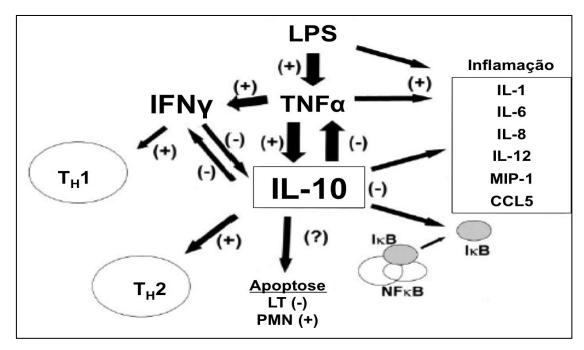
Acreditamos que o encontro de níveis elevados da IL-1β parece estar relacionado ao início da sepse uma vez que esta esteve diminuída em pacientes que apresentaram aumento dos níveis de IL-6. Em relação a expressão clínica a IL-1β é conhecida por ser um importante pirógeno endógeno estimulando o centro termoregulatório do hipotálamo a produzir febre o que foi condizente com os achados nos paciente com infecção. Um dos sinais mais observados neste grupo foi a alteração na temperatura corporal. (Figura 5)

A IL-8 está associada a fator de predição de gravidade da infecção. (49) Os níveis elevados da IL-8 nas crianças infectadas apesar de parecerem maior nos pacientes com choque séptico não se confirmou na amostra estudada (Tabela 12).

#### 5.1.2 Citocinas anti-inflamatórias

A resposta inflamatória é normalmente acompanhada por uma resposta anti-inflamatória via aumento da produção da IL-4, IL-10 dentre outros com o objetivo de controlar e limitar a resposta imune nesses pacientes.<sup>62</sup>

O encontro de uma maior concentração de IL-10 nos pacientes com infecção pode indicar a presença precocemente intensa de um mecanismo contra-regulatório desencadeado pelo processo infeccioso vigente conforme ilustrado pela figura abaixo. 63



**Figura 26 –** Regulação da IL-10 pelo TNF- $\alpha$  e endotoxinas. Fonte: Oberholzer et al., 2002

Sabe-se que a IL-10 atua por feedback negativo, ou seja, enquanto o TNF- $\alpha$  e outras citocinas estimulam a síntese de IL-10 na vigência de estímulo inflamatório, esta bloqueia a síntese de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 pelos monócitos a medida que ocorre a resolução do processo inflamatório levando a normalização dos níveis séricos das citocinas. restaurando е homeostase. 64,65 Assim, não só o período da coleta com relação ao início do processo inflamatório/infeccioso como os altos níveis de IL-10 podem ter contribuído para a detecção dos baixos níveis séricos de TNF-\alpha via feedback negativo (Tabela 12). Além disso assim como sugerido na literatura, a magnitude da resposta da IL-10 pareceu se correlacionar com a gravidade do

processo inflamatório, a concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias e o grau de maturação das células dendríticas.<sup>66,67</sup>

## 5.2 Caracterização das células dendríticas (DCs)

As células dendríticas foram descritas inicialmente por Steinmen et al. em 1973 e derivam de células progenitoras da medula óssea. <sup>68,69</sup>

Sabe-se que as DCs são células apresentadoras de antígenos com capacidade de estimular a resposta de células T CD4 e T CD8, produzir citocinas e ser responsável pela apresentação de antígenos às células T. As células dendríticas expressam o repertório mais amplo dos TLRs o que permite reconhecer múltiplos componentes microbianos. Após o estímulo infeccioso ou inflamatório as DCs imaturas passam por um complexo processo de maturação que resulta na sua migração dos tecidos para órgãos linfóides secundários e upregulation de MHC e moléculas co-estimulatórias que são essenciais para o estímulo das células T.<sup>69</sup>

A depender do estado de maturação e ativação (CD83+) são capazes de expressar altos níveis de moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 além de HLA-DR sendo excelentes estimuladoras de células T antígeno-específicas.  $^{70,71}$  Ainda, as DCs representam uma fonte importante da IL-12, citocina essa que é chave na resposta inata e polarização  $T_{\rm H}1$  dos linfócitos T helper. Shin et al. (2009) e Koumbi et al. (2010) mostram que DCs mielóides são caracterizadas por expressarem CD11c $^{+}$  e induzem diferenciação de células Th1. Já DCs plasmocitóides expressam CD123 $^{\rm high}$  e induzem diferenciação de células  $T_{\rm H}2.^{51,72}$ 

Diferentemente do descrito na literatura este trabalho mostrou que as DCs nos grupos 1 e 2 esteve presente em maior quantidade em número absoluto quando comparado ao grupo 3 mas com frequência semelhante. Conforme observado nas figuras 9 e 10 apesar do processo infeccioso estar bem estabelecido nos RN pela avaliação clínica e laboratorial não houve maior expressão de moléculas co-estimuladoras nas amostras de sangue periférico nem maior expressão dos TLRs. No período neonatal é descrito que a resposta

da DCp parece estar globalmente prejudicada bem como há uma diferença qualitativa da resposta imune da DCc quando comparado ao indivíduo adulto.<sup>10</sup>

A expressão semelhante de CD1a, CD80 e CD86 indicaria uma manutenção na frequência de células imaturas frente a um quadro infeccioso e não um aumento da frequência de células ativas conforme esperado. Ainda, observamos que houve uma frequência e MFI semelhante de TLR-2 e TLR-4 expressos em CDs de adultos, RN saudáveis e com quadro infeccioso com exceção da menor frequência de TLR-4 expresso nas DCs plasmocitóides de RN com infecção em comparação aos adultos (Figura 10), achados esses condizentes com os relatos da literatura.

A gravidade clínica e a positividade das culturas dentre os RN com infecção pareceu estar relacionada com maior expressão de TLR entre alguns subgrupos mas esses achados se mostraram aleatórios e apenas sugestivos de uma tendência de ativação ineficaz desse grupo celular.<sup>73</sup>

Associado a esses achados podemos deduzir que a produção semelhante de IL-12 nos pacientes dos grupo 1 e 2 (RN com e sem infecção) poderia estar relacionada a baixa ativação das células dendríticas e não à pura migração dessas para os tecidos diminuindo sua identificação em sangue periférico.

#### 5.3 Caracterização dos monócitos

Os monócitos são células do sistema fagocitário e exercem importante papel na imunidade inata e adquirida através da sua ação sobre o processo inflamatório ou como fonte dos macrófagos e células dendríticas.

Pode-se observar que frente a um estímulo infeccioso a população de recém-nascidos analisada apresentou menor quantidade de células ativadas (MFI para CD86 menor que no indivíduo adulto) em sangue periférico sugerindo um menor potencial de atividade da APC no RN, dado esse de acordo com a literatura (Figura 14).<sup>37</sup>

O comportamento dos TLR no RN seja ele saudável ou com infecção é controverso.

Segundo Levy et al. (2007) embora a expressão basal dos receptores Toll-like em monócitos de RN de termo seja similar ao de adultos as consequências funcionais da ativação são bem diferentes já que se observa menor produção de TNF- $\alpha$  nos RN e menor expressão das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86. Diferentemente do referido, nossos dados mostram que apesar da expressão basal do TLR-2 e TLR-4 ter sido significativamente maior nos RN com infecção, a produção do TNF- $\alpha$  foi semelhante à encontrada em RN com e sem infecção assim como foi semelhante a expressão de CD80 e menor de CD86 corroborando a hipótese de disfunção do sistema imune inato (Tabela 12 e Figura 14).

Além disso, a maior frequência observada da expressão do TLR-4 e do MFI do TLR-2 nos monócitos de RN com infecção (Figura 15) é compatível com os achados da literatura que demonstraram um *up-regulation* na expressão de TLR-2 e TLR-4 em monócitos isolados de pacientes com sepse além de demonstrar um acentuado aumento da expressão de TLR-4 nos fagócitos já no início dos sintomas bem como mudanças significantes na expressão de TLR-2.<sup>74</sup> Por outro lado, o *up-regulation* do TLR-4 em monócitos humanos parece estar relacionado ao estímulo da IL-2 e INFγ <sup>75</sup> fato esse não constatado pelos nossos resultados já que não houve diferença na produção de IL-2 dentre os grupos analisados.

Semelhante a Viemann et al. (2005) os níveis de expressão de TLR-2 foram ligeiramente menores em monócitos de neonatos sadios comparados aos adultos (Figura 15). Por outro lado, este autor não encontrou nenhuma diferença na expressão de TLR-4 enquanto que nesta pesquisa observamos que houve maior frequência de monócitos que expressaram TLR-4 nos RN com infecção comparados a RN sadios e adultos.<sup>1</sup>

A maior gravidade clínica isto é, o choque séptico, esteve relacionado com uma maior frequência do TLR-4 e menor expressão do TLR-2. Acreditamos que seja devido ao fato dos pacientes com choque séptico não terem como agente isolado os cocos Gram-positivos em culturas mas sim terem apresentado cultura positiva para BGN em 2 casos e culturas negativas em 3 casos. Já os pacientes com sepse apresentaram maior MFI para TLR-2 em monócitos provavelmente devido a presença de fungos e cocos Gram-

positivos como agentes do quadro infeccioso. Os pacientes com sepse grave apresentaram a resposta descrita anteriormente tanto para o TLR-2 quanto para o TLR-4, compatível com os agentes causadores de infecção neste grupo.

A presença de cultura positiva esteve associada a uma maior frequência na expressão do TLR-4 enquanto que a presença de infecção com cultura negativa mostrou-se associada a um maior MFI para TLR-2 comparativamente ao RN saudável pela análise uni e multivariada.

A identificação de uma bactéria Gram-positiva esteve associada a maior MFI para TLR-2 que os RN sem infecção, dado este amplamente confirmado na literatura. De forma intrigante observamos que a análise da frequência e do MFI do TLR-4 também esteve aumentado quando o agente isolado foi uma bactéria Gram-positiva. Apesar do TLR-4 estar fortemente associado a identificação do LPS de bactérias Gram-negativas há relatos esparsos na literatura onde esse receptor também pôde ser ativado pelo ácido lipoteicóico em estudos em animais. 80,81

Assim sendo, os resultados sugerem que o TLR-2 e o TLR-4 apresentam uma expressão maior frente a um processo infeccioso mas correspondente ao MFI e frequência respectivamente em grupos de recémnascidos com infecção sem agente identificado. É possível que o tipo de microrganismo tenha a ver com a precocidade na resposta então seria interessante verificar a sequência da resposta dos TLR em relação ao tempo de infecção bem como da expressão das moléculas indicativas de ativação celular.

## 5.4 Caracterização dos linfócitos T (LT)

Os linfócitos T são componentes do sistema imune adaptativo responsáveis pela imunidade celular e se caracterizam por um grande repertório de especificidade para diferentes antígenos. Alguns LT no entanto apresentam pouca diversidade desses receptores antígeno-específicos e assim expressam receptores que reconhecem os PAMPs.

Como já bem estabelecido na literatura há nos primeiros anos de vida um número elevado de linfócitos tanto percentual como absolutos no sangue periférico. Conforme observado na nossa casuística a frequência de linfócitos totais foi semelhante entre os RN saudáveis e adultos e mostrou-se diminuída nos RN com infecção o que poderia estar relacionado a uma polarização da resposta inflamatória para outros grupos celulares (Figura 19).

Observa-se ainda no RN uma maior frequência de LT *naive* e uma menor frequência das populações de LT efetor, de memória central e efetora e menor expressão das moléculas CD28 e CD25 comparativamente ao adulto. Esse comportamento das subpopulações de LT é esperado pelo pouco tempo para ocorrer o estímulo antigênico necessário para o desenvolvimento de uma resposta imune de memória na faixa etária neonatal. Assim, a proporção de células T *naive* é elevada nos primeiros tempos de vida e cai gradualmente na medida em que crescem as percentagens de células de memória e se estabelece a imunidade imune adquirida. <sup>82</sup>

A semelhança entre os grupos 1 e 2 na frequência das subpopulações de LT analisadas sugeriu que o comportamento entre os grupos seja um reflexo de uma possível imaturidade na resposta imune adaptativa no RN infectado. É fato sabido que após a detecção do patógeno pela DC esta sofre uma processo de maturação e migração para o linfonodo mais próximo onde o contato com o LT será responsável por desencadear sinais co-estimulatórios secundários (aumenta expressão de CD80, CD86 na DC e CD 28 no LT). Acreditamos que a ausência de resposta se deva pelo menos em parte a interação inadequada entre as DCs e os LT conforme demonstrado nos nossos resultados onde a frequência das moléculas co-estimuladoras nos pacientes com infecção foi semelhante na DC e até diminuída no LT comparativamente aos indivíduos dos grupos 2 e 3 (Figura 20 e 21).

A presença dos TLR nos LT não foi investigada neste trabalho. A literatura mostra que enquanto não se detectaram esses receptores na superfície de LT não ativados de sangue periférico pela citometria de fluxo sua presença (TLR-2 e 4) em LT ativado e LT de memória pôde ser constatada pelo mesmo método em adultos. 83,84

Assim, é possível com os dados apresentados considerar que alterações funcionais nas células apresentadoras de antígenos já descritas na literatura

podem levar a deficiências secundárias nas respostas de células T adaptativas. 41,42

### 5.5 Caracterização dos linfócitos B (LB)

Os linfócitos B, assim como os LT, também são componentes do sistema imune adaptativo mas com importante papel na resposta imune humoral via produção de anticorpos. Nossos resultados confirmam os dados da literatura que mostram uma proporção de LB semelhante em RN e adultos mas um número absoluto significantemente maior no primeiro grupo. <sup>85</sup> Na presença de infecção (grupo 1) a queda observada no número absoluto de LB e manutenção na frequência dessa população celular provavelmente ocorreu pela tendência a neutrofilia dentro do contexto infeccioso.

Sabe-se que a produção de anticorpos no RN apresenta menor duração, tem um início tardio, difere na distribuição dos isótipos de IgG (menores títulos de IgG2) e apresenta menor afinidade de resposta do que no indivíduo adulto. 86,87

Ainda é descrito que os linfócitos B de memória e *naïve* podem ser ativados através da ligação do CD40, receptor expresso constitutivamente nessas células, ao seu ligante CD154 (CD40L) presente nos linfócitos T. A interação entre esses dois receptores inicia uma função central na formação do centro germinativo e desenvolvimento da memória humoral, indução da proliferação, *switch* de classes de imunoglobulinas, diferenciação e secreção de citocinas e imunoglobulinas.<sup>88</sup>

Na nossa amostra não houve mudança na expressão dessa molécula, o CD40, o que indicaria um prejuízo da resposta do RN infectado para reconhecimento do antígeno e ativação do linfócito T frente a um quadro infeccioso. Por outro lado, ocorreu aumento na frequência da expressão do marcador de ativação CD69 high. Esses achados são compatíveis com estudos em RN humanos onde houve menor expressão dos receptores celulares de superfície CD21, CD40, CD80 e CD86 além de alterações nos centros germinativos em formação que se normalizaram com 1 mês de vida.

Os LB humanos expressam constitutivamente vários tipos de TLR, mas enquanto alguns trabalhos mostram que houve a identificação de todos os TLR em LB com expressão variável outros mostram que isso não ocorreu o TLR-4.<sup>84</sup> A expressão desses receptores parece ser controversa e varia conforme o tipo de TLR avaliado e o grau de ativação celular.<sup>89-91</sup> Foi descrito na literatura que o sinergismo entre o receptor de célula B e os TLRs aumenta a expressão de NF-kB e MAPK p38 e assim promove ativação, proliferação e diferenciação do LB.<sup>92,93</sup> Na nossa casuística observamos que houve detecção dos receptores TLR-2 e 4 nos LB e apesar da baixa frequência nos três grupos esta foi maior no grupo 1 em relação ao grupo 3.

Os efeitos descritos dos TLR no LB humanos indicam que a expressão do TLR-4 pode de fato ser induzida por determinados estímulos como pela IL-4 promovendo ativação e diferenciação celular. No nosso trabalho essa relação pareceu pouco provável já que apesar da maior frequência de expressão do TLR-4 nos LB do grupo 1 a produção de IL-4 nos pacientes avaliados foi semelhante a despeito do estímulo infeccioso.

Com relação ao TLR-2 foi descrito que seus ligantes podem ativar o LB agindo como mitogênico cujos efeitos fisiológicos precisam ser melhor caracterizados. A expressão do TLR-2 no LB frente a um quadro infeccioso não se mostrou consistente neste trabalho.

Dessa maneira mais uma vez podemos considerar que alterações funcionais propiciam a maior susceptibilidade do RN a processos infecciosos.

\_ 6 CONCLUSÕES

As análises realizadas sugerem que há uma reposta específica do RN frente a um processo infeccioso bem como uma predominância da ação da resposta imune inata em relação à resposta imune adaptativa no RN através dos seguintes achados:

- 1- Diminuição do número de leucócitos nos RN com choque séptico dos quais 40% foram a óbito e linfopenia nos RN com infecção.
- 2- Maior produção de citocinas pró e anti-inflamatórias no RN com sepse logo na suspeita diagnóstica.
- 3- Ausência de mudança na expressão de IL-2 e IL-4 nos RN com infecção sugerindo baixa inter-relação entre os sistemas imune inato e adquirido.
- 4- Manutenção ou diminuição na expressão de moléculas co-estimuladoras em células dendríticas, monócitos, linfócitos T e B sugestivo de um menor potencial de ativação das APCs.
- 5- Com relação ao comportamento dos receptores Toll-like 2 e 4 observamos uma tendência no RN, não muito consistente, a uma maior frequência desses receptores nos monócitos de RN frente a um quadro infeccioso mas não nas células dendríticas.

\_\_\_\_\_ 7 LIMITES DO ESTUDO E SUGESTÃO

## 7.1 Limites do estudo

Encontramos nesse trabalho dificuldade técnica e logística quanto à coleta de sangue de RN principalmente daqueles sem quadro de infecção, tanto pelo perfil dos RN admitidos na unidade que tende para pacientes com malformações congênitas cirúrgicas como pelo volume de sangue necessário para as análises. Assim, o pequeno número de amostras (18 RN sem infecção e 27 RN com infecção) e faixa etária foram fatores limitantes deste trabalho.

## 7.2 Sugestão

O seguimento do estudo com ampliação no número de pacientes em cada fase da sepse do RN e dados em sequência pode aprofundar os conhecimentos da resposta imune nesta população inclusive para compreensão da evolução ou mudança de terapêutica.

	_ 8 ANEXOS

#### Anexo 1

# HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJE	ITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL
1.NOME:::	
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :	<b>SEXO:</b> .M
DATA NASCIMENTO://	
ENDEREÇO:	Nº APTO:
BAIRRO:	CIDADE
CEP:TELEFON	IE: DDD ()
2.RESPONSAVEL LEGAL	
	ador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :	SEXO: M - F -
DATA NASCIMENTO:://	NO ARTO
ENDEKEÇU:	APTO:
	CIDADE:
CEP:IELEFU	NE:DDD ()
DADOS SO	DBRE A PESQUISA
	A: Avaliação da resposta inflamatória e da resposta
	ntígeno em recém-nascidos de termo com sepse
tardia.	lligeno em recem-nascidos de termo com sepse
PESQUISADOR: Prof. Dra. Maria Esther Ju	urfact Pivara Caccon
	ISCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: Nº40229
UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade de Cuid	
	ados intensivos Neonatai (OCINE)
2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:	
RISCO MÍNIMO 🛛	RISCO MÉDIO □
RISCO BAIXO X	RISCO MAIOR
KIGGO BAIAO A	NISCO MAION 1
3.DURAÇÃO DA PESQUISA :.12 meses (ab	ril 2012 a abril 2013)

# HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Uma das principais complicações dos recém-nascidos durante seu período de internação é a infecção apesar dos avanços no cuidado e tratamento. O tipo de infeção, sua localização e extensão tem impacto importante na vida futura do indivíduo. No entanto, no período neonatal (primeiro mês de vida) a identificação do quadro infeccioso é difícil já que sua manifestação é por vezes sutil, podendo ser somente uma variação na temperatura ou alteração da atividade do bebê, entre outros. Por isso, exames de sangue são rotineiramente solicitados para ajudar no diagnóstico.

O motivo pelo qual os recém nascidos apresentam infecções que o sistema imunológico, de defesa, não consegue controlar de maneira adequada ainda não está totalmente esclarecido.

## HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Sabe-se que é necessário uma resposta rápida do indivíduo e da proteção conferida pela mãe durante o final da gestação.

Assim, as informações que estão sendo fornecidas pela sua participação voluntária neste estudo, visam analisar substâncias do sangue que atuam na defesa do organismo do recém-nascido contra infecções ajudando a compreender melhor essa resposta para orientar quanto aos cuidados.

Para tal, deverá ser coletado amostra de sangue por punção de veia periférica do antebraço no mesmo momento da coleta dos outros exames de sangue colhidos rotineiramente para confirmar o diagnóstico da infecção. Essa amostra de sangue extra irá ser processada e analisada no laboratório específico do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas de São Paulo.

Como possível complicação da coleta do sangue a criança sentirá um desconforto doloroso leve e pode apresentar uma pequena mancha roxa no local que desaparecerá em poucos dias.

Não haverá benefício direto para o participante do estudo já que o tratamento com medicações apropriadas já será iniciado tão logo haja suspeita da infecção. Somente no final poderemos concluir a presença de alguma resposta imunológica individual diferenciada que poderia sugerir maior propensão a quadros infecciosos.

Apesar disso em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra Ana Carolina Costa Redondo que pode ser encontrada no endereço Rua Dr Eneas de Carvalho Aguiar, 647 P4 UCINE, Telefone (11) 26618590. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

A qualquer momento é garantida a liberdade da retirada de consentimento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente. Ainda, caso haja algum resultado parcial que seja do conhecimento dos pesquisadores o participante ou responsável legal deverá ser mantido atualizado independentemente do final do período da pesquisa.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Comprometemo-nos a utilizar os dados e o material coletado somente para essa pesquisa em questão.

## HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Avaliação da expressão dos receptores Toll-like 2 e 4 (TLR-2 e 4) na célula apresentadora de antígeno em recém-nascidos de termo com infecção bacteriana"

Eu discuti com a Dra. *Ana Carolina Costa Redondo* sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

	-
Assinatura do paciente/representante legal	Data//
(Somente para o responsável do projeto)	
Declaro que obtive de forma apropriada e vo	luntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste
paciente ou representante legal para a partic	ipação neste estudo.
Assinatura do responsável pelo estudo	Data / /

#### Anexo 2

Metodologia utilizada para realização de exames laboratoriais

- Hemograma completo (Volume de sangue: 0,5 mL):
- Hemoglobina: método da cianometahemoglobina;
- Hematócrito: método do microhematócrito (centrifugação capilar);
- Leucócitos: contagem global automatizada, diferencial em lâmina,
   coloração de Leishman;
  - Hemácias: contagem global automatizada;
  - Plaquetas: método de Fonio;
- Hemocultura (Volume de sangue: 1 mL): repliques sucessivos em meio de ágar sangue até isolamento do agente etiológico:
- Urina (Volume de sangue: 5 mL): quantitativo em placa com identificação específica conforme crescimento bacteriano

## Líquor:

-Bioquímica:

Glicose: método de glicose-oxidase;

Proteína: método do TCA (ácido tricloroacético);

Cloretos: método titulométrico;

-Cultura: semeadura em placa (ágar chocolate);

Volume do líquor: 3 mL quimiocitológico e 1 mL para cultura e bacterioscópico.

Anexo 3

Dados demográficos individuais e mediana do peso à admissão, sexo, início dos sintomas e idade na coleta dos recém-nascidos diagnosticados com sepse neonatal (Grupo 1)

RN	Peso à admissão (g)	Sexo	Início dos Sintomas (dias)	Idade na Coleta (dias)
1	2560	F	21	23
2	2990	F	15	20
3	3700	М	31	31
4	3655	F	10	12
5	2880	М	13	16
6	3850	F	44	45
7	3100	F	6	9
8	2200	F	32	34
9	3340	F	14	15
10	3000	М	3	3
11	2260	F	27	29
12	3200	F	10	12
13	3460	М	18	21
14	2405	М	92	93
15	3575	F	3	3
16	3075	М	22	23
17	2430	М	8	9
18	3685	М	2	4
19	3465	М	29	30
20	3270	М	25	26
21	3070	F	8	13
22	3490	М	23	25
23	3885	М	41	41
24	2200	F	5	5
25	3100	М	54	57
26	3210	F	20	21
27	2650	М	26	28
lediana	3150	13F:14M	20	21
IQR	(2823-3511)		(8-29)	(12-30)

RN: recém-nascido; F: feminino; M: masculino; IQR: Intervalo interquertil (p25-p75).

Dados demográficos individuais e mediana do peso à admissão, sexo, início dos sintomas e idade na coleta dos recém-nascidos diagnosticados sem infecção (Grupo 2)

RN	Peso à admissão (g)	Sexo	Início dos Sintomas (dias)	Idade na Coleta (dias)
1	3230	F	-	2
2	3580	F	-	8
3	2755	F	-	3
4	3610	F	-	9
5	3430	М	-	16
6	3695	M	-	18
7	2930	F	-	7
8	2960	F	-	15
9	3690	M	-	10
10	2930	F	-	35
11	2960	M	-	35
12	3690	F	-	15
13	2830	F	-	4
14	3185	F	-	17
15	3120	M	-	17
16	3130	F	-	33
17	3400	M	-	12
18	3150	F	-	25
Mediana IQR	3168 (2953-3588)	12F:6M	-	12,5 (7-17)

RN: recém-nascido; F: feminino; M: masculino; IQR: Intervalo interquertil (p25-p75).

Anexo 4

Exames laboratoriais e características clínicas dos recém-nascidos diagnosticados com sepse neonatal clínica ou bacteriológica (Grupo 1)

RN	SHR	PCR (md/L)	Cultu líqu este	ido	Sina Clíni		Diagnóstic	o Bacteriológico
			(+)	(-)	(+)	(-)	Sítio	Agente
1	1	1,2		Χ	Χ			
2	0	82,9		Χ	Χ			
3	1	39,5	X		Χ		НМСр	S. epidermidis Oxa R
4	1	11,2		Χ	Χ			
5	1	0,8		Χ	Χ			
6	0	8,4	Χ		Χ		URC	E. coli
7	0	224	X		Χ		НМСр	S. aureus Oxa S
8	4	35,2		Χ	Χ			
9	0	8,4		Χ	Χ			
10	2	14,1		Χ	Χ			
11	1	123	Χ		Χ		НМСр	Candida parapsilosis
12	0	85,5		Χ	Χ		Secreção ocular	s. epidermidis
13	0	41,8		X	Х		Secreção ocular	S. coagulase negativo Haemophilus influenzae
14	1	65,2		Χ	Χ			
15	0	43		Χ	Χ			
16	3	25,6		Χ	Χ			
17	3	83,1		Χ	Χ		HMCp + HMCc	S. epidermidis Oxa R
18	1	291		Χ	Χ			
19	5	145	Х		Х		НМСр НМСс	Enterobacter cloacae Candida parapsilosis
20	0	4,5		Χ	Χ			
21	4	15,4		Χ	Χ		PCR nasofaringe	Bordetella pertussis
22	0	20,6		Χ	Χ			
23	3	56,5		Χ	Χ		Líquido ascítico	BGN
24	0	2,8		Χ	Χ			
25	5	9	Χ		Χ		НМСр	Salmonela SP
26	1	17,7	X		Χ		HMCp + HMCc	S. epidermidis Oxa R
27	2	99,2	Х		Χ		HMCp +URC	E. coli

RN: recém-nascido; SHR: Score Hematológico de Rodwell; PCR: Proteína C Reativa; +: positivo; -: negativo; X: presente; HMCp: hemocultura periférica; HMCc: hemocultura central; URC: urocultura.

Dados sobre a apresentação clínica, diagnóstico e evolução clínica dos pacientes com infecção (Grupo 1)

RN	Anresentesão Clínico	Diagnástica Clínica	Evolução Cl	ínica
KIN	Apresentação Clínica	Diagnóstico Clínico	Alta hospitalar	Óbito
1	Sepse Grave	SNNT	Х	
2	Sepse	SNNT + Pneumonia	Χ	
3	Sepse	SNNT	Χ	
4	Choque séptico	SNNT	X	
5	Sepse Grave	SNNT	Χ	
6	Sepse Grave	SNNT + Ventriculite	X	
7	Sepse	SNNT + Osteomielite em tíbia direita		Х
8	Sepse Grave	SNNT	X	
9	Sepse	SNNT + Mastite	Χ	
10	Sepse	SNNT	X	
11	Sepse Grave	SNNT	Χ	
12	Sepse	SNNT + Pneumonia	Χ	
13	Sepse	SNNT + Pneumonia	Χ	
14	Choque Séptico	SNNT	Χ	
15	Sepse	SNNT	Χ	
16	Sepse	SNNT	X	
17	Sepse Grave	SNNT	Χ	
18	Sepse Grave	SNNT + Celulite	Χ	
19	Sepse Grave	SNNT	Χ	
20	Sepse	SNNT + meningite	Χ	
21	Sepse Grave	SNNT + Penumonia	Χ	
22	Sepse Grave	SNNT	Χ	
23	Choque Séptico	SNNT + ECN		Х
24	Choque Séptico	SNNT	X	
25	Sepse Grave	SNNT + desidratação grave	Χ	
26	Sepse Grave	SNNT	X	
27	Choque Séptico	SNNT		Χ

RN: recém-nascido; SNNT: sepse neonatal tardia; X: presente; ECN: enterocolite necrosante.

Exames laboratoriais, características clínicas e evolução clínica dos recémnascidos sem infecção (Grupo 2)

RN	SHR	PCR (mg/dL)	Sina Clíni		Diagnóstico Clínico	Evolução Clí	nica
		(mg/ac)	(+)	(-)	-	Alta hospitalar	Óbito
1	0	5,6		Χ	RN abandonado na rua	Х	
2	0	0,3		Χ	Baixo ganho ponderal por baixa ingesta	X	
3	1	0		Χ	Risco infeccioso descartado	X	
4	0	1,6		Χ	9º Pós operatório de HDC	X	
5	0	4		Χ	Icterícia do RN	Χ	
6	0			Χ	Icterícia do RN	X	
7	0	1,8		Χ	Onfalite descartada	X	
8	-	-		Χ	Anóxia neonatal	Χ	
9	0	0,9		Χ	Icterícia do RN	Χ	
10	0	1,4		Χ	DRGE	Χ	
11	0	14,5		Χ	Hipertermia	X	
12	-	-		Χ	Laringomalácia	X	
13	0	1,1		Χ	RN	X	
14	-	-		Χ	11º Pós operatório de HDC		Х
15	-	-		Χ	Obstrução de coana	X	
16	-	-		Χ	Baixo ganho ponderal	X	
17	0	0,94		Χ	Icterícia do RN	X	
18	-	-		Χ	Icterícia do RN	X	

RN: recém-nascido; SHR: Score Hematológico de Rodwell; PCR: Proteína C Reativa; +: positivo; -: negativo; X: presente; HDC: hérnia diafragmática congênita; DRGE: doença do refluxo gastroesofágico.

Anexo 5

Dosagem de citocinas nas amostras de soro de recém-nascidos com infecção (Grupo 1)

RN				Citocina	as (pg/mL	)			
	IL-8	IL-6	IL-12p70	IL-1β	IL-10	TNF-α	IL-2	IL-4	IL-17A
1	41,3	31,2	0,8	2,3	1,4	2,0	ND	1,1	ND
2	123,4	15,3	0,05	2,8	3,5	1,0	1,8	0,4	ND
3	255,3	>5000,0	1,3	17,4	5,3	1,5	1,4	ND	ND
4	2132,6	>5000,0	ND	5,8	173,3	1,5	1,4	ND	283,2
5	132,3	>5000,0	1,1	1,6	2,5	2,6	6,3	ND	ND
6	133,5	312,4	1,8	4,0	5,8	1,6	1,7	ND	ND
7	161,3	132,3	0,05	17,6	6,7	3,9	1,8	ND	ND
8	2318,5	157,4	ND	10,2	16,8	ND	2,8	0,3	121,4
9	19,6	9,7	ND	ND	2,0	1,0	ND	ND	38,4
10	75,2	17,3	3,3	0,5	1,2	2,1	ND	ND	ND
11	304,6	233,8	4,2	4,3	17,8	1,8	ND	ND	ND
12	312,5	58,1	3,9	3,0	22,6	1,8	ND	ND	ND
13	181,6	97,3	2,1	7,3	7,1	2,7	ND	ND	ND
14	384,3	100,0	5,3	1,1	15,2	1,2	ND	ND	ND
15	2174,7	63,1	2,9	244,0	9,4	7,4	1,8	ND	ND
16	55,0	152,5	3,6	0,7	2,7	0,7	2,0	2,2	75,6
17	51,4	4,3	2,7	0,4	1,6	1,7	ND	ND	ND
18	387,4	709,9	3,9	15,3	3,3	0,3	ND	ND	ND
19	351,4	754,0	4,7	1,6	351,5	22,0	2,4	ND	48,3
20	77,9	55,0	5,7	1,0	33,4	1,2	2,2	0,5	ND
21	84,8	31,2	3,1	1,0	2,3	0,5	ND	ND	ND
22	134,0	91,2	0,4	1,8	26,4	ND	ND	ND	ND
23	98,0	143,5	0,5	1,8	1,5	0,3	ND	ND	ND
24	298,6	323,6	ND	5,1	129,7	0,9	ND	ND	19,5
25	44,1	1,8	0,1	2,0	4,4	0,6	0,5	2,4	9,1
26	51,9	2,5	0,2	0	10,8	0,2	1,4	3,2	33,8
27	>5000,0	>5000,0	0,2	7,0	311,5	0,7	1,7	1,2	101,2

ND: não detectado. As cores indicam Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico

Dosagem de citocinas nas amostras de soro de recém-nascidos sem infecção (Grupo 2)

RN	Citocinas (pg/mL)								
	IL-8	IL-6	IL-12p70	IL-1β	IL-10	TNF-α	IL-2	IL-4	IL-17A
1	119,4	266,0	ND	ND	2,0	0,3	NR	NR	NR
2	120,3	6,4	0,7	1,0	2,6	1,6	NR	NR	NR
3	19,9	0,6	0,7	ND	0,5	0,6	NR	NR	NR
4	36,5	14,1	8,5	6,6	2,8	10,5	NR	NR	NR
5	700,6	23,2	3,5	6,4	1,4	2,7	1,6	ND	ND
6	84,3	9,0	2,1	1,0	15,7	1,1	5,6	1,0	ND
7	44,4	6,0	0,4	1,0	3,0	0,8	ND	ND	51,4
8	18,0	2,2	0,6	0,7	1,0	0,3	2,0	0,6	ND
9	13,5	1,0	0,8	0,3	1,5	1,0	2,9	1,2	112,3
10	18,9	9,8	ND	1,3	2,1	0,8	1,6	0,3	39,8
11	21,7	3,3	0,4	0,4	4,1	0,7	0,0	1,3	0,2
12	62,9	3,8	0,5	1,2	4,4	2,4	1,6	2,3	7,7
13	13,0	1,6	0,2	1,6	2,2	ND	1,7	0,3	14,7
14	65,2	2,0	0,4	0,3	1,3	0,1	0,2	ND	9,7
15	24,8	48,8	ND	1,4	2,7	0,3	0,3	1,0	11,2
16	65,7	2,5	0,2	0,2	1,7	0,3	1,7	2,3	10,3
17	33,3	4,1	1,6	ND	1,7	0,4	2,4	0,0	4,3
18	31,8	1,8	1,4	0,3	2,5	ND	6,3	1,8	127,0

ND: não detectado; NR: não realizado.

N= número da amostra; IL= interleucina; TNF = fator de necrose tumoral

Frequência de grupos celulares (DC) analisados por imunofenotipagem no sangue periférico de recém-nascidos com infecção (Grupo 1)

Anexo 6

RN	N leucócitos totais	N DC LIN- HLADR+ Totais	% DC LIN- HLADR+ Totais	% CD11c	% CD11c CD1a	% CD11c CD80	% CD11c CD86	% CD11c TLR-2	% CD11c TLR-4
1	10,4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	14,4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3	16,4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4	5,6	39	ND	6,2	13,10	68,90	44,30	73,40	68,90
5	7,2	72	1,1	10,7	24,80	63,00	92,90	55,00	12,20
6	5,5	22	1,8	16,2	4,80	69,00	66,70	17,20	73,80
7	16,2	57	0,05	23,6	2,10	89,60	18,80	30,00	81,20
8	6,4	70	ND	5,8	30,30	23,00	73,00	18,60	9,80
9	19,8	141	ND	39,7	ND	16,10	76,00	7,00	25,50
10	11,7	20	3,3	61,5	ND	37,50	87,50	73,30	37,50
11	3,5	16	4,2	37,1	ND	33,20	65,80	81,80	52,60
12	13,8	273	3,9	62,1	18,20	22,10	23,20	15,00	27,70
13	8,4	42	2,1	23,0	6,30	10,00	4,35	12,90	10,20
14	3,9	20	5,3	29,0	49,40	27,80	65,20	37,80	7,80
15	25,0	388	2,9	29,3	64,70	25,50	72,20	33,60	74,90
16	28,1	108	3,6	36,2	9,14	27,50	76,20	65,80	40,80
17	41,85	408	2,7	14,2	20,30	16,10	20,30	31,20	11,00
18	9,35	80	3,9	31,6	12,60	42,10	93,10	23,60	83,40
19	22,8	179	4,7	43,9	18,00	32,40	43,20	28,20	10,40
20	8,0	112	5,7	44,4	38,30	28,40	81,10	21,20	17,00
21	41,6	244	3,1	13,3	15,00	35,90	23,40	20,60	20,40
22	10,6	195	0,4	16,7	18,20	17,20	41,90	20,00	24,30
23	5,3	235	0,5	14,6	7,90	0,00	79,00	21,60	34,70
24	10,9	801	0,0	10,7	67,70	4,30	62,40	0,80	61,90
25	16,5	350	0,1	66,3	77,20	60,10	96,80	31,30	92,90
26	13	123	0,2	14,5	24,30	9,70	29,50	7,72	12,30
27	6,5	31	0,2	20,9	16,20	11,50	3,40	1,40	39,10

N: número; DC LIN-HLADR+: células dendríticas; CD11c: células dendríticas mielóides; imaturas (CD1a); CD80 e CD86: marcadores de ativação. Cores representam: Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico.

Frequência de grupos celulares (DC) analisados por imunofenotipagem no sangue periférico de recém-nascidos com infecção (Grupo 1)

RN	N leucócitos totais	N DC LIN- HLADR+ Totais	% DC LIN- HLADR+ Totais	% CD123	% CD123 CD1a	% CD123 CD80	% CD123 CD86	% CD123 TLR-2	% CD123 TLR-4
1	10,4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	14,4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3	16,4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4	5,6	39	ND	10,20	22,00	25,00	37,00	35,90	14,00
5	7,2	72	1,1	10,30	30,30	56,30	50,20	21,10	5,60
6	5,5	22	1,8	27,00	24,30	47,10	38,60	18,60	62,90
7	16,2	57	0,05	3,90	12,50	12,50	12,50	16,70	12,50
8	6,4	70	ND	8,20	31,60	29,20	78,90	ND	6,40
9	19,8	141	ND	12,90	ND	16,10	32,20	ND	19,50
10	11,7	20	3,3	6,90	ND	ND	66,70	20,00	ND
11	3,5	16	4,2	24,60	ND	24,00	55,50	57,90	33,20
12	13,8	273	3,9	43,90	32,80	25,20	32,30	26,40	31,30
13	8,4	42	2,1	39,00	11,40	7,80	9,50	9,35	14,60
14	3,9	20	5,3	49,60	20,70	13,00	42,20	28,40	4,44
15	25,0	388	2,9	67,90	63,40	68,40	48,80	14,20	36,40
16	28,1	108	3,6	40,00	22,50	34,10	59,70	57,20	26,30
17	41,85	408	2,7	25,50	25,00	10,50	19,20	15,10	15,20
18	9,35	80	3,9	28,10	37,50	47,40	84,40	25,00	76,30
19	22,8	179	4,7	36,10	28,90	32,50	47,20	34,90	12,20
20	8,0	112	5,7	24,00	85,20	31,80	45,30	55,50	20,20
21	41,6	244	3,1	22,40	18,40	7,10	33,00	5,70	2,50
22	10,6	195	0,4	20,90	39,20	9,20	37,20	33,80	18,90
23	5,3	235	0,5	22,90	36,60	1,20	51,70	20,60	7,50
24	10,9	801	ND	37,40	26,30	2,70	37,50	0,20	27,90
25	16,5	350	0,1	85,50	61,60	46,30	90,50	16,30	84,90
26	13	123	0,2	33,80	57,00	4,16	18,60	3,79	5,28
27	6,5	31	0,2	40,40	51,50	3,30	3,30	0,50	13,40

N: número; DC LIN-HLADR+: células dendríticas; CD123: células dendríticas plasmocitóides; imaturas (CD1a); CD80 e CD86: marcadores de ativação; ND: não detectado; NA: não analisado. Cores representam: Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico.

Frequência de grupos celulares (monócito) analisados por imunofenotipagem no sangue periférico de recém-nascidos com infecção (Grupo 1)

RN	N leucócitos totais	N CD14 HLA DR	% CD14 HLA DR	% CD14 CD80	% CD14 CD86	% CD14 TLR-2	% CD14 TLR-4
1	10,4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	14,4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3	16,4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4	5,6	235	4,20	5,70	84,6	99,70	17,10
5	7,2	122	1,70	0,80	15,0	96,80	16,00
6	5,5	149	2,70	14,50	91,3	99,40	58,20
7	16,2	178	1,10	9,90	81,3	72,30	64,90
8	6,4	2259	35,30	2,50	90,8	96,90	8,25
9	19,8	2891	14,60	15,60	98,7	96,70	4,40
10	11,7	854	7,30	8,00	95,0	96,30	13,80
11	3,5	160	4,57	13,70	95,7	86,40	80,60
12	13,8	489	3,54	19,60	83,8	87,90	26,40
13	8,4	193	2,30	9,55	98,6	100,00	ND
14	3,9	183	4,70	22,50	92,2	98,60	32,60
15	25,0	2133	8,53	2,94	96,4	92,10	4,95
16	28,1	315	1,12	11,80	94,9	95,50	9,80
17	41,85	1632	3,90	86,30	92,3	89,60	72,10
18	9,35	140	1,50	25,40	94,8	79,00	33,80
19	22,8	798	3,50	12,60	88,1	54,60	17,60
20	8,0	137	1,71	12,10	86,0	33,30	9,90
21	41,6	832	2,00	6,50	89,1	91,90	10,70
22	10,6	339	3,20	1,55	95,6	97,90	6,20
23	5,3	98	1,84	2,80	86,7	43,60	27,50
24	10,9	185	1,70	3,60	92,3	37,80	18,50
25	16,5	1172	7,10	19,00	99,8	92,40	30,50
26	13	608	4,68	21,60	89,5	6,87	21,30
27	6,5	65	1,00	93,80	97,9	81,40	98,80

N: número; CD14+HLA-DR+:monócito; CD80 e CD86: marcadores de ativação; ND: não detectado; NA: não analisado. Cores representam: Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico.

Frequência de grupos celulares (linfócito T) analisados por imunofenotipagem no sangue periférico de recém-nascidos com infecção (Grupo 1)

RN	N Linfócitos Totais	% Linfócitos Totais	% LT CD3 CD4	% LT naive	% LT efetor	% LT memória central	% memória efetora	% CD123 CD40L	% CD123 CD28	% CD123 CD25
1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4	453	8,09	30,8	47,20	1,50	14,90	7,10	66,20	93,00	11,80
5	1778	24,70	63,5	71,00	0,22	2,70	3,50	16,10	77,50	5,70
6	1172	21,30	43,4	86,30	1,10	2,00	2,00	83,40	79,20	6,20
7	2171	13,40	52,4	77,70	0,869	1,40	1,54	11,90	95,00	13,50
8	1939	30,30	13,8	15,30	13,80	17,40	13,00	3,00	72,90	10,90
9	2633	13,30	34,5	2,60	10,60	12,40	18,00	6,40	4,40	3,85
10	1016	8,68	42,1	89,20	4,92	1,05	1,28	10,80	90,40	5,05
11	1516	43,30	51,1	88,80	1,51	4,08	3,58	14,60	94,60	84,30
12	1904	13,80	53,4	54,30	3,71	1,81	3,72	59,40	87,20	16,20
13	1705	20,30	32,8	65,80	0,092	3,45	8,28	93,80	98,00	10,60
14	234	6,01	38,9	21,50	9,83	18,50	21,90	22,50	49,60	20,00
15	13925	55,70	63,1	51,10	0,274	9,00	8,36	84,60	87,80	8,80
16	4637	16,50	39,0	63,70	3,42	0,594	1,58	17,70	86,70	96,90
17	13183	31,50	65,9	23,00	7,57	3,36	0,65	22,30	97,70	5,57
18	251	2,68	28,0	36,90	4,28	17,20	1,85	14,30	64,60	12,40
19	10876	47,70	49,1	79,70	0,086	3,20	1,85	58,50	99,10	11,70
20	872	10,90	65,3	34,10	8,37	13,90	3,77	2,35	14,70	4,75
21	13770	33,10	43,8	22,30	0,615	13,80	5,31	16,80	99,60	14,60
22	4452	42,00	51,8	9,27	0,727	15,00	8,30	11,30	91,10	67,10
23	2873	54,20	66,6	51,40	ND	19,20	5,77	ND	ND	ND
24	3085	28,30	31,6	51,10	2,57	28,30	10,10	2,15	3,13	61,10
25	7227	43,80	46,7	63,60	10,70	10,90	10,00	1,35	99,90	5,90
26	6266	48,20	66,8	2,01	1,30	48,40	48,60	4,40	85,80	0,343
27	884	13,60	46,5	29,40	1,30	8,15	3,10	8,00	90,50	3,00

N: número; T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>: Linfócito T; LT *naive*: CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>; LT efetor: CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>CD69<sup>+</sup>; LT memória central: CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>; LT memória efetora: CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD27; ND: não detectado; NA: não analisado. Cores representam: Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico.

Frequência de grupos celulares (linfócito B) analisados por imunofenotipagem no sangue periférico de recém-nascidos com infecção (Grupo 1)

RN	N Linfócitos Totais	% Linfócitos Totais	% LB CD19+	% LB naive	% LB memória	% LB ativado	% CD40+	% CD69 high	% LB TLR-2	% LB TLR-4
1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4	453	8,09	2,55	64,0	36,00	1,27	41,40	0,847	0,424	0,424
5	1778	24,70	6,10	83,4	16,60	0,75	25,60	0,50	0,333	0,20
6	1172	21,30	9,40	93,8	6,16	4,75	68,70	1,30	0,54	0,324
7	2171	13,40	11,40	79,3	20,70	3,39	77,60	1,65	0,174	0,956
8	1939	30,30	1,80	49,3	50,70	7,20	51,80	2,20	1,70	24,00
9	2633	13,30	14,30	96,6	3,40	2,90	62,70	3,49	0,52	7,94
10	1016	8,68	14,60	96,4	3,59	15,30	92,20	4,59	1,44	2,73
11	1516	43,30	5,47	82,1	17,90	30,90	84,40	4,66	1,68	0,745
12	1904	13,80	7,88	77,1	22,90	14,60	81,20	9,53	0,134	0,268
13	1705	20,30	15,30	93,4	6,60	0,135	ND	0,515	0,144	0,081
14	234	6,01	16,60	83,2	16,80	15,50	63,10	4,28	0,59	2,21
15	13925	55,70	5,27	74,8	25,20	1,96	67,10	4,70	2,54	1,37
16	4637	16,50	19,70	86,9	13,10	2,98	63,10	0,88	0,685	0,391
17	13183	31,50	10,10	69,1	30,90	13,80	77,80	1,15	0,574	ND
18	251	2,68	5,34	85,9	14,10	1,56	54,70	5,47	3,12	1,56
19	10876	47,70	21,20	93,2	6,82	1,44	17,70	1,37	0,624	1,49
20	872	10,90	2,30	74,8	25,20	24,80	4,26	8,53	0,775	2,71
21	13770	33,10	15,30	66,3	33,70	1,17	65,70	1,20	0,338	0,282
22	4452	42,00	21,90	93,6	6,44	1,00	79,50	1,00	0,435	0,218
23	2873	54,20	5,17	89,9	10,10	1,95	82,90	1,56	1,95	0,973
24	3085	28,30	13,70	92,2	7,80	2,19	23,80	3,21	1,09	3,50
25	7227	43,80	17,00	97,8	2,15	33,30	80,00	2,30	0,063	0,063
26	6266	48,20	13,60	52,0	48,00	0,558	9,99	6,14	ND	0,124
27	884	13,60	18,30	71,0	29,00	2,50	30,30	9,10	0,738	0,791

N: número; Linfócito B total: CD19+; Linfócito B *naive*: CD19+CD27-; Linfócito B memória: CD19+CD27+; Linfócito B ativado: CD19+CD69+CD40+; ND: não detectado; NA: não analisado. Cores representam: Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico.

MFI de grupos celulares (DC) analisados por imunofenotipagem no sangue periférico de recém-nascidos com infecção (Grupo 1)

	MFI							
RN	CD11a	CD11a	CD11a	CD11a	CD123	CD123	CD123	CD123
	CD80	CD86	TLR-2	TLR-4	CD80	CD86	TLR-2	TLR-4
1	NA							
2	NA							
3	NA							
4	9375	7982	13300	4220	5066	3461	13100	4816
5	4735	6103	5574	26500	3605	4722	11100	20600
6	33100	20300	16100	5790	23000	18900	16100	3912
7	3300	1018	3168	2165	ND	ND	ND	69,9
8	2084	5773	2433	3890	1215	9724	ND	ND
9	2375	2147	3323	5465	2358	3515	ND	5930
10	4057	1348	8801	7943	ND	1458	2737	ND
11	3967	2264	14400	8055	3437	2573	14500	7540
12	2186	3003	4683	2580	2171	2349	1340	3012
13	2887	3923	2280	2753	1498	2855	2198	2106
14	3054	2202	2248	1198	2780	2186	1719	829
15	3682	2140	2541	2088	1170	1712	2134	2135
16	5009	2326	3486	1458	2699	2703	3528	1820
17	3008	7138	2879	6299	2426	4190	3501	2658
18	12500	3558	6488	2242	10600	4103	6635	2358
19	8010	7488	5321	6607	8308	8533	6290	6255
20	2999	3286	6133	5830	5167	6506	2772	4624
21	10600	3510	3003	2372	7615	1008	2624	2322
22	7965	10700	1916	3755	3726	10800	1513	4232
23	ND	9106	1615	2236	2041	5814	1454	1827
24	1442	7904	951	5760	1257	3950	1868	3295
25	8988	10200	6710	3263	9014	6976	6710	3169
26	24200	2945	3159	5725	23100	3195	3258	5725
27	1831	4700	98,5	1139	39600	9684	98,5	1145

MFI: mediana da intensidade de fluorescência; DC: células dendríticas; CD11c: células dendríticas mielóides; CD123: células dendríticas plasmocitóides; imaturas (CD1a); CD80 e CD86: marcadores de ativação; ND: não detectado; NA: não analisado. Cores representam: Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico.

MFI de grupos celulares (Monócito, LB e LT) analisados por imunofenotipagem no sangue periférico de recém-nascidos com infecção (Grupo 1)

RN	MFI CD14 CD80	MFI CD14 CD86	MFI CD14 TLR-2	MFI CD14 TLR-4	MFI LT CD28	MFI LT CD25	MFI LB CD69 high
1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4	1798	4102	91900	1480	1268	5127	12300
5	1379	2118	68700	1161	922	4572	6533
6	6673	2403	74800	3204	883	5847	23100
7	2505	9965	80400	4276	758	6524	7168
8	862	6479	12400	2023	1078	4296	45200
9	2110	11900	13100	6786	2105	4433	16900
10	4771	6132	4309	5278	1310	3012	11300
11	687	5045	4304	2727	1505	3200	16300
12	2217	3817	8892	4304	1130	4198	13600
13	1419	5051	22400	7701	715	4149	31400
14	1686	16600	15300	1708	1202	5442	31000
15	1479	3561	2972	2453	1120	5338	15900
16	1426	6816	8631	5661	623	3578	10200
17	4510	15500	5504	12600	1158	2075	16500
18	928	5955	3486	4515	638	1394	6882
19	1210	1488	10900	3819	2402	7551	12400
20	514	2340	2309	1463	419	3471	10400
21	1080	7467	10100	1307	2189	2647	17500
22	1521	1898	4884	2971	512	1653	15600
23	1547	8992	2765	2072	ND	ND	16300
24	996	5666	1630	2570	622	2585	7383
25	1048	5562	3537	1346	2614	2446	26000
26	2928	3737	4611	3771	963	3610	9428
27	1633	4056	2271	3843	791	1463	10900

MFI: mediana da intensidade de fluorescência; CD14: monócito; CD80 e CD86: marcadores de ativação; LT: linfócito T; LB: linfócito B; ND: não detectado; NA: não analisado. Cores representam: Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico.

Anexo 7

Frequência de grupos celulares (DC) analisados por imunofenotipagem no sangue periférico de recém-nascidos sem infecção (Grupo 2)

RN	N leucócitos totais	N DC LIN- HLADR+ Totais	% DC LIN- HLADR+ Totais	% CD11c	% CD11c CD1a	% CD11c CD80	% CD11c CD86	% CD11c TLR-2	% CD11c TLR-4
1	12,3	266,0	0,629	13,100	0,00	97,90	44,70	85,70	85,10
2	9,4	6,4	1,040	11,700	24,20	39,00	87,00	51,30	16,60
3	11,05	0,6	1,030	15,800	10,20	15,00	87,10	49,60	10,20
4	17,6	14,1	0,620	10,100	8,30	4,20	85,40	2,50	12,50
5	9,3	23,2	6,740	51,000	34,50	19,50	47,20	21,50	9,60
6	8,4	9,0	1,510	24,700	10,00	24,50	23,20	24,30	78,20
7	15,5	6,0	2,920	53,300	53,60	43,40	74,30	20,80	42,30
8	8,9	2,2	4,100	18,500	74,20	36,90	92,40	24,00	70,30
9	10,5	1,0	2,530	47,600	21,60	14,80	62,50	4,28	80,20
10	8,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
11	7,7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
12	10,6	3,8	0,788	37,800	11,50	3,85	67,80	3,10	35,60
13	13,6	1,6	0,400	49,000	30,90	9,50	74,50	15,80	2,80
14	17,2	2,0	0,990	24,000	17,40	56,50	71,70	52,00	91,30
15	20,7	48,8	0,693	13,100	28,20	52,80	69,30	43,90	80,40
16	12,9	2,5	0,764	11,900	42,40	28,40	80,50	17,10	11,00
17	13,8	4,1	1,320	27,000	42,70	6,05	90,40	19,10	14,90
18	9,5	1,8	1,360	28,400	49,30	4,24	95,50	14,80	7,71

N: número; DC LIN-HLADR+: células dendríticas; CD11c: células dendríticas mielóides; imaturas (CD1a); CD80 e CD86: marcadores de ativação; ND: não detectado; NA: não analisado.

Frequência de grupos celulares (DC) analisados por imunofenotipagem no sangue periférico de recém-nascidos sem infecção (Grupo 2)

RN	N leucócitos totais	N DC LIN- HLADR+ Totais	% DC LIN- HLADR+ Totais	% CD123	% CD123 CD1a	% CD123 CD80	% CD123 CD86	% CD123 TLR-2	% CD123 TLR-4
1	12,3	266,0	ND	67,80	0,00	86,10	79,90	60,00	94,70
2	9,4	6,4	0,7	7,60	37,70	36,30	34,20	28,20	17,10
3	11,05	0,6	0,7	20,10	4,94	6,25	23,10	ND	4,36
4	17,6	14,1	8,5	11,30	1,85	0,00	55,60	ND	0,00
5	9,3	23,2	3,5	39,60	43,90	18,50	48,30	23,20	5,40
6	8,4	9,0	2,1	20,30	34,30	18,20	12,70	8,00	85,60
7	15,5	6,0	0,4	47,30	54,70	47,30	54,50	23,60	49,90
8	8,9	2,2	0,6	39,70	41,20	41,30	89,10	29,40	95,40
9	10,5	1,0	0,8	22,60	42,10	5,38	31,80	3,23	42,70
10	8,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
11	7,7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
12	10,6	3,8	0,5	47,70	18,90	4,95	19,60	10,70	34,00
13	13,6	1,6	0,2	57,20	58,90	9,90	63,60	12,60	4,30
14	17,2	2,0	0,4	8,85	41,20	29,40	52,90	15,40	47,10
15	20,7	48,8	ND	22,70	22,30	20,20	26,20	5,04	28,70
16	12,9	2,5	0,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	13,8	4,1	1,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	9,5	1,8	1,4	ND	ND	ND	ND	ND	ND

N: número; DC LIN-HLADR+: células dendríticas; CD123: células dendríticas plasmocitóides; imaturas (CD1a); CD80 e CD86: marcadores de ativação; ND: não detectado; NA: não analisado.

Frequência de grupos celulares (monócito) analisados por imunofenotipagem no sangue periférico de recém-nascidos sem infecção (Grupo 2)

RN	N leucócitos	N CD14	% CD14			% CD14	% CD14
	totais	HLA DR	HLA DR	CD80	CD86	TLR-2	TLR-4
1	12,3	77	0,628	8,66	82,4	97,30	6,83
2	9,4	602	6,40	0,16	ND	95,90	32,70
3	11,05	473	4,280	26,30	81,1	78,40	19,90
4	17,6	2059	11,70	11,70	98,8	97,60	7,70
5	9,3	467	5,020	3,20	80,2	81,30	24,40
6	8,4	126	1,50	13,60	97,3	94,40	14,70
7	15,5	512	3,30	15,20	98,7	97,40	14,10
8	8,9	306	3,44	37,00	98,3	97,90	35,80
9	10,5	370	3,52	17,40	98,3	71,40	15,30
10	8,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
11	7,7	NA	NA	NA	NA	NA	NA
12	10,6	1102	57,90	99,3	78,60	4,90	10,40
13	13,6	1061	5,70	100,0	94,00	4,00	7,80
14	17,2	587	3,55	95,2	94,60	7,97	3,41
15	20,7	859	6,20	98,6	98,80	3,10	4,15
16	12,9	682	13,80	92,2	89,00	6,84	5,29
17	13,8	1085	10,00	94,2	94,50	12,90	7,86
18	9,5	531	9,25	97,4	88,50	9,98	5,59

N: número; CD14+HLA-DR+:monócito; CD80 e CD86: marcadores de ativação; ND: não detectado; NA: não analisado.

Frequência de celulares (linfócito T) analisados por imunofenotipagem no sangue periférico de recém-nascidos sem infecção (Grupo 2)

RN	N Linfócitos	% Linfócitos	% LT CD3 CD4	% LT naive	% LT efetor	% LT memória	% memória	% CD123	% CD123	% CD123
	Totais	Totais	CD4			central	efetora	CD40L	CD28	CD25
1	733	5,96	41,2	49,00	3,91	2,43	3,12	23,90	99,40	4,09
2	2782	29,60	62,7	89,50	0,25	0,031	0,096	10,00	65,20	5,90
3	6542	59,20	51,9	57,30	0,902	2,04	5,01	75,90	97,50	14,10
4	2200	12,50	61,6	73,10	0,10	9,40	7,20	88,50	98,60	8,30
5	3311	35,60	48,1	53,70	0,449	24,00	1,87	13,00	87,20	5,30
6	2041	24,30	36,3	25,00	0,446	21,70	6,53	28,40	97,80	5,48
7	9114	58,80	58,5	63,80	0,829	12,90	5,30	74,00	95,20	11,80
8	4940	55,50	58,9	54,30	0,763	20,90	7,76	77,20	97,30	10,40
9	4904	46,70	52,3	60,30	3,61	11,50	7,80	7,70	97,90	6,84
10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
11	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
12	1961	18,50	31,5	43,20	0,80	14,50	16,70	69,30	98,90	10,25
13	7915	58,20	56,9	32,00	10,60	18,20	24,10	0,037	100,00	6,14
14	8789	51,10	65,3	80,20	0,711	4,38	2,24	87,10	99,00	5,24
15	9212	44,50	39,9	71,50	0,779	15,20	4,26	76,50	97,30	10,80
16	7121	55,20	28,2	42,90	0,66	5,88	15,30	0,88	96,90	9,27
17	7217	52,30	55,2	41,50	0,354	7,35	13,60	0,806	97,70	8,73
18	5035	53,00	56,7	36,00	0,191	9,31	16,70	0,84	94,50	5,82

N: número; T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>: Linfócito T; LT *naive*: CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>; LT efetor: CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>CD69<sup>+</sup>; LT memória central: CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>; LT memória efetora: CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD27; ND: não detectado; NA: não analisado.

Frequência de grupos celulares (linfócito B) analisados por imunofenotipagem no sangue periférico de recém-nascidos sem infecção (Grupo 2)

RN	N Linfócitos Totais	% Linfócitos Totais	% LB CD19+	% LB naive	% LB memória	% LB ativado	% CD40+	% CD69 high	% LB TLR-2	% LB TLR-4
1	733	5,96	30,50	76,1	23,90	16,10	5,28	16,80	8,07	42,50
2	2782	29,60	4,80	78,6	21,40	0,22	44,10	0,65	0,65	0,40
3	6542	59,20	17,00	90,5	9,52	1,18	41,50	0,764	0,059	0,353
4	2200	12,50	10,90	83,9	16,10	0,996	67,80	2,50	1,30	0,362
5	3311	35,60	6,42	70,6	29,40	0,32	55,00	5,92	1,60	2,24
6	2041	24,30	15,70	97,5	2,54	0,894	13,30	2,96	2,73	0,141
7	9114	58,80	5,43	76,9	23,10	1,59	77,00	4,95	1,41	1,41
8	4940	55,50	7,29	80,7	19,30	1,62	77,60	24,80	1,62	1,24
9	4904	46,70	7,12	70,3	29,70	2,97	58,40	1,56	1,13	ND
10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
11	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
12	1961	18,50	25,10	96,3	7,75	0,043	ND	0,64	0,085	0,043
13	7915	58,20	11,60	55,3	44,70	25,40	70,80	2,50	0,545	0,182
14	8789	51,10	5,52	81,6	18,40	1,66	2,16	2,33	0,332	2,49
15	9212	44,50	6,22	87,1	12,90	0,315	86,50	1,10	0,157	0,315
16	7121	55,20	12,90	81,0	19,00	1,47	69,20	2,86	3,48	1,08
17	7217	52,30	12,00	76,5	23,50	1,40	30,60	3,68	2,89	0,963
18	5035	53,00	9,78	69,2	30,80	0,531	67,60	0,744	1,81	0,531

N: número; Linfócito B total: CD19+; Linfócito B *naive*: CD19+CD27-; Linfócito B memória: CD19+CD27+; Linfócito B ativado: CD19+CD69+CD40+; ND: não detectado; NA: não analisado.

MFI de grupos celulares (DC) analisados por imunofenotipagem no sangue periférico de recém-nascidos sem infecção (Grupo 2)

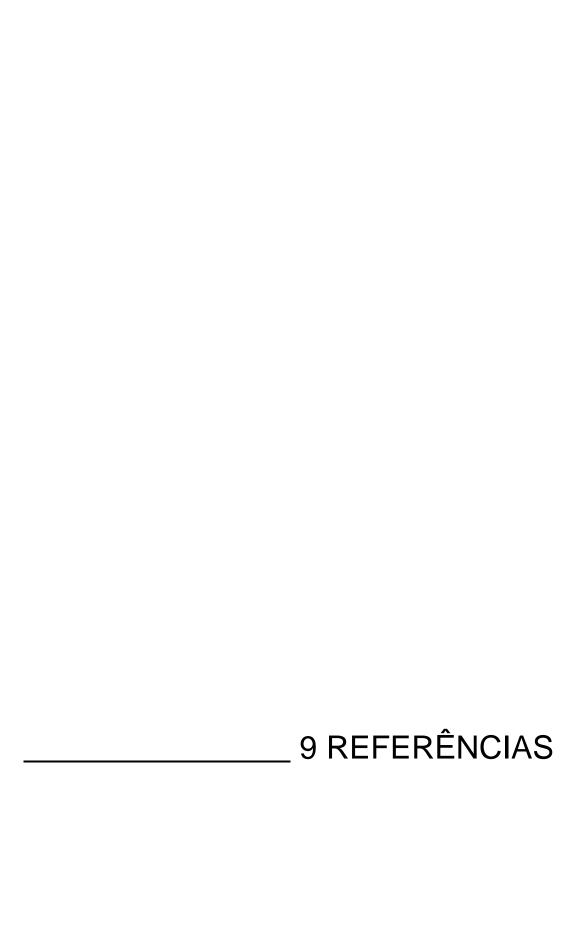
RN	MFI CD11a	MFI CD11a	MFI CD11a	MFI CD11a	MFI CD123	MFI CD123	MFI CD123	MFI CD123
	CD80	CD86	TLR-2	TLR-4	CD80	CD86	TLR-2	TLR-4
1	8215	3016	11100	9402	3761	1598	11100	6370
2	5138	5980	6202	7744	4836	6255	5389	5605
3	1712	3877	2847	15500	1410	6124	ND	8863
4	1623	1865	60,5	1145	ND	2038	ND	ND
5	2272	3876	4696	55200	2745	3600	2593	70100
6	2460	3809	2120	2433	1816	1578	2144	2416
7	8355	7980	8473	9756	8605	15100	9014	9199
8	28700	14500	8473	9756	7599	8149	8332	10100
9	1334	4369	9752	24800	1954	3505	1341	3708
10	NA							
11	NA							
12	11600	5336	9167	3197	1932	2498	1852	3115
13	4782	4762	1819	3133	4012	4063	1839	2255
14	4669	2970	3277	1551	8192	2673	1702	1786
15	16200	4334	3137	1998	17200	8521	1479	2290
16	1125	3309	1208	3496	ND	ND	ND	ND
17	1532	2339	1332	4776	ND	ND	ND	ND
18	1766	2381	1282	4483	ND	ND	ND	ND

MFI: mediana da intensidade de fluorescência; DC: células dendríticas; CD11c: células dendríticas mielóides; CD123: células dendríticas plasmocitóides; imaturas (CD1a); CD80 e CD86: marcadores de ativação; ND: não detectado; NA: não analisado.

MFI de grupos celulares (Monócito, LB e LT) analisados por imunofenotipagem no sangue periférico de recém-nascidos sem infecção (Grupo 2)

RN	MFI CD14	MFI CD14	MFI CD14	MFI CD14	MFI LT	MFI LT	MFI LB CD69
	CD80	CD86	TLR-2	TLR-4	CD28	CD25	high
1	1743	4014	85700	4643	1108	4898	7321
2	4149	4683	71100	2248	846	4912	41700
3	977	10900	12400	2043	1179	7610	18300
4	1631	6390	4598	3400	1536	5814	29200
5	990	5119	2991	1608	740	2871	11500
6	2573	5362	3348	2429	3178	4870	14800
7	1203	8656	3658	4298	971	2399	16300
8	1052	10300	3816	4346	917	2491	15100
9	1203	10600	1979	2937	1120	2322	15200
10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
11	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
12	556	4787	2635	1653	1384	3923	18900
13	976	7409	2124	1702	2944	2570	23400
14	3240	5422	7342	2439	3250	6979	20100
15	1248	7821	12400	3168	3122	7876	20500
16	1254	3832	1717	3950	1445	2005	12100
17	1573	3794	1584	1951	1464	2058	7636
18	1446	4426	1114	2661	1243	2023	4521

MFI: mediana da intensidade de fluorescência; CD14: monócito; CD80 e CD86: marcadores de ativação; LT: linfócito T; LB: linfócito B; ND: não detectado; NA: não analisado.



- 1. Viemann D, Dubbel G, Schleifenbaum S, Harms E, Sorg C, Roth J. Expression of toll-like receptors in neonatal sepsis. Pediatric research. 2005 Oct;58(4):654–9.
- 2. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL; International Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee: American Association of Critical-Care Nurses; American College of Chest Physicians; American College of Emergency Physicians; Canadian Critical Care Society; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; European Society of Intensive Care Medicine; European Respiratory Society; **International Sepsis** Forum; Japanese Association for Acute Medicine; Japanese Society of Intensive Care Medicine; Society of Critical Care Medicine; Society of Hospital Medicine; Surgical Infection Society; World Federation of Societies of Intensive and Critical Care Medicine. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. Crit Care Med. 2008 Jan;36(1):296-327
- 3. PrabhuDas M, Adkins B, Gans H, King C, Levy O, Ramilo O, Siegrist CA. Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines. Nat Immunol. 2011 Mar;12(3):189-94.
- 4. Camacho-Gonzalez A, Spearman PW, Stoll BJ. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. Pediatr Clin North Am. 2013 Apr;60(2):367-89
- 5. Bedford Russell AR. Neonatal sepsis. Paediatr Child Health. 2011 Jun;21(6):265–9.
- 6. Cianciarullo MA, Costa IDC, Esther M, Ceccon J, Krebs VLJ. Novos x antigos marcadores de infecção no diagnóstico de sepse neonatal2: visão crítica. Pediatria São Paulo. 2008 30(2):107-117

- 7. Matsuda A, Jacob A, Wu R, Aziz M, Yang WL, Matsutani T, Suzuki H, Furukawa K, Uchida E, Wang P. Novel therapeutic targets for sepsis: regulation of exaggerated inflammatory responses. J Nippon Med Sch. 2012;79(1):4-18.
- 8. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992 Jun;101(6):1644-55. Review.
- 9. Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. Pediatr Crit Care Med. 2005 Jan;6(1):2-8
- 10. Kollmann TR, Crabtree J, Rein-Weston A, Blimkie D, Thommai F, Wang XY, Lavoie PM, Furlong J, Fortuno ES 3rd, Hajjar AM, Hawkins NR, Self SG, Wilson CB. Neonatal innate TLR-mediated responses are distinct from those of adults. J Immunol. 2009 Dec 1;183(11):7150-60.
- 11. Yoon HS. Neonatal innate immunity and Toll-like receptor. Korean journal of pediatrics. Korean J Pediatr. 2010 Dec;53(12):985-8
- 12. Maródi L. Neonatal Innate Immunity to Infectious Agents. Infect Immun. 2006 Apr;74(4):1999-2006. Review.
- 13. Zhang J, Yang YI, Levy O, Chen C. Human neonatal peripheral blood leukocytes demonstrate pathogen-specific coordinate expression of TLR2, TLR4/MD2, and MyD88 during bacterial infection in vivo. Pediatric Research. 2010 Dec;68(6):479-83.
- 14. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science. 1999 May 21;284(5418):1313-8. Review.
- 15. Ceccon MEJR. Novas Perspectivas na Sepse Neonatal Pediatria. 2008 30(4):198–202.

- 16. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. Biochim Biophys Acta. 2002 Feb 13;1589(1):1-13. Review
- 17. Bochud P-Y, Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. BMJ 2003 Feb 1;326(7383):262-6
- 18. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell 2006 Feb 24;124(4):783-801.
- 19. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jan 20;95(2):588-93.
- 20. Rehli M. Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. Trends Immunol. 2002 Aug;23(8):375-8.
- 21. Zarember KA, Godowski PJ. Tissue Expression of Human Toll-Like Receptors and Differential Regulation of Toll-Like Receptor mRNAs in Leukocytes in Response to Microbes, Their Products, and Cytokines. J Immunol. 2002 Jan 15;168(2):554-61.
- 22. Akira S. Mammalian Toll-like receptors. Curr Opin Immunol. 2003 Feb;15(1):5-11. Review.
- 23. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. J Immunol. 2000 Jun 1;164(11):5998-6004
- 24. Tipping PG. Toll-like receptors: the interface between innate and adaptive immunity. J Am Soc Nephrol. 2006 Jul;17(7):1769-71.
- 25. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. J Allergy Clin Immunol. 2006 May;117(5):979-87

- 26. Mollen KP, Anand RJ, Tsung A, Prince JM, Levy RM, Billiar TR. Emerging paradigm: toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. Shock. 2006 Nov;26(5):430-7
- 27. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology, Philadelphia: Elsevier, 7th edition, 2011. (1st edition published in 1991).
- 28. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. Nature. 2004 Jul 8;430(6996):257-63.
- 29. Dostert C, Tschopp J. Detecting fungal pathogens. Nat Immunol. 2007 Jan;8(1):17-8.
- 30. Higgins SC, Lavelle EC, McCann C, Keogh B, McNeela E, Byrne P, O'Gorman B, Jarnicki A, McGuirk P, Mills KH. Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to Bordetella pertussis by inhibiting inflammatory pathology. J Immunol. 2003 Sep 15;171(6):3119-27.
- 31. Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. Nat Rev Immunol. 2006 Nov;6(11):823-35. Review.
- 32. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. Nat Rev Immunol. 2007 May;7(5):379-90
- 33. Nguyen M, Leuridan E, Zhang T, De Wit D, Willems F, Van Damme P, Goldman M, Goriely S. Acquisition of adult-like TLR4 and TLR9 responses during the first year of life. PLoS One. 2010 Apr 28;5(4):e10407.
- 34. Kollmann TR, Levy O, Montgomery RR, Goriely S. Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly. Immunity. 2012 Nov 16;37(5):771-83.
- 35. Förster-Waldl E, Sadeghi K, Tamandl D, Gerhold B, Hallwirth U, Rohrmeister K, Hayde M, Prusa AR, Herkner K, Boltz-Nitulescu G, Pollak A, Spittler A. Monocyte toll-like receptor 4 expression and LPS-induced cytokine

- production increase during gestational aging. Pediatr Res. 2005 Jul;58(1):121-4.
- 36. Wynn JL, Levy O. Role of innate host defenses in susceptibility to early-onset neonatal sepsis. Clin Perinatol. 2010 Jun;37(2):307-37.
- 37. Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. J Immunol. 2000 Jul 15;165(2):618-22.
- 38. Liu J. Dendritic Cell, Toll-Like Receptor, and The Immune System Cancer Mol. 2(6): 213-215, 2006
- 39. McGreal EP, Hearne K, Spiller OB. Off to a slow start: under-development of the complement system in term newborns is more substantial following premature birth. Immunobiology. 2012 Feb;217(2):176-86.
- 40. Wolach B, Carmi D, Gilboa S, Satar M, Segal S, Dolfin T, Schlesinger M. Some aspects of the humoral immunity and the phagocytic function in newborn infants. Isr J Med Sci. 1994 May-Jun;30(5-6):331-5.
- 41. Zinkernagel RM. Maternal Antibodies, Childhood Infections, and Autoimmune Diseases. N Engl J Med. 2001 Nov 1;345(18):1331-5. Review.
- 42. Velilla PA, Rugeles MT, Chougnet CA. Defective antigen-presenting cell function in human neonates. Clin Immunol. 2006 Dec;121(3):251-9.
- 43. Goldstein B, Giroir B, Randolph A; International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. Pediatr Crit Care Med. 2005 Jan;6(1):2-8
- 44. Kuch BA, Carcillo JA, Han YY, Orr RA. Definitions of pediatric septic shock. Pediatr Crit Care Med. 2005 Jul;6(4):501
- 45. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME,

Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb S, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R; Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including The Pediatric Subgroup. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. Intensive Care Med. 2013 Feb;39(2):165-228.

- 46. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med. 2003 Apr;31(4):1250-6.
- 47. Rodwell RL, Leslie AL, Tudehope DI. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system. Indian J Med Sci. 2001 Sep;55(9):495-500.
- 48. Khair KB, Rahman MA, Sultana T, Roy CK, Rahman MQ, Ahmed AN. Early diagnosis of neonatal septicemia by hematologic scoring system, C-reactive protein and serum haptoglobin. Mymensingh Med J. 2012 Jan;21(1):85-92.
- 49. Overall JC Jr. Neonatal bacterial meningitis. Analysis of predisposing factors and outcome compared with matched control subjects. J Pediatr. 1970 Apr;76(4):499-511.
- 50. Klein JO MS. Bacterial sepsis and meningitis. In: Remington JS KJ, editor. Infection diseases of the fetus and newborn infant. 4 ed. Philadelphia Saunders; 1995. p. 835–90
- 51. Koumbi LJ, Papadopoulos NG, Anastassiadou V, Machaira M, Kafetzis DA, Papaevangelou V. Dendritic cells in uninfected infants born to hepatitis B virus-positive mothers. Clin Vaccine Immunol. 2010 Jul;17(7):1079-85.
- 52. Sorg RV, Kögler G, Wernet P. Identification of cord blood dendritic cells as an immature CD11c- population. Blood. 1999 Apr 1;93(7):2302-7.

- 53. Schreibelt G, Tel J, Sliepen KH, Benitez-Ribas D, Figdor CG, Adema GJ, de Vries IJ. Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. Cancer Immunol Immunother. 2010 Oct;59(10):1573-82.
- 54. Sánchez-Torres C, García-Romo GS, Cornejo-Cortés MA, Rivas-Carvalho A, Sánchez-Schmitz G. CD16+ and CD16- human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells. Int Immunol. 2001 Dec;13(12):1571-81.
- 55. Tanel A, Fonseca SG, Yassine-Diab B, Bordi R, Zeidan J, Shi Y, Benne C, Sékaly RP. Cellular and molecular mechanisms of memory T-cell survival. Expert Rev Vaccines. 2009 Mar;8(3):299-312.
- 56. Cuenca AG, Wynn JL, Moldawer LL, Levy O. Role of innate immunity in neonatal infection. Am J Perinatol. 2013 Feb;30(2):105-12.
- 57. Casey LC. Immunologic response to infection and its role in septic shock. Crit Care Clin. 2000 Apr;16(2):193-213.
- 58. Loisa P, Rinne T, Laine S, Hurme M, Kaukinen S. Anti-inflammatory cytokine response and the development of multiple organ failure in severe sepsis. Acta Anaesthesiol Scand. 2003 Mar;47(3):319-25.
- 59. Ulloa L, Tracey KJ. The "cytokine profile": a code for sepsis. Trends Mol Med. 2005 Feb;11(2):56-63.
- 60. Chirico G, Loda C. Laboratory aid to the diagnosis and therapy of infection in the neonate. Pediatr Rep. 2011 Feb 24;3(1):e1.
- 61. Lin KJ, Lin J, Hanasawa K, Tani T, Kodama M. Interleukin-8 as a predictor of the severity of bacteremia and infectious disease. Shock. 2000 Aug;14(2):95-100.
- 62. Sikora JP, Chlebna-Sokół D, Krzyzańska-Oberbek A. Proinflammatory Cytokines (IL-6, IL-8), Cytokine Inhibitors (IL-6sR, sTNFRII) in the

- Pathogenesis of Sepsis in Newborns and Infants. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2001;49(5):399-404.
- 63. Wereszczyńska-Siemiatkowska U, Kosel J, Siemiatkowski A. Biological properties of interleukin 18. Pol Merkur Lekarski. 2004 Mar;16(93):279-81. Review. Polish.
- 64. Steinke JW, Borish L. 3. Cytokines and chemokines. J Allergy Clin Immunol. 2006 Feb;117(2 Suppl Mini-Primer):S441-5.
- 65. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: A New Hypothesis for Pathogenesis of the Disease Process. Chest. 1997 Jul;112(1):235-43. Review.
- 66. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. Crit Care Med. 2002 Jan;30(1 Supp):S58-S63.
- 67. Samarasinghe R, Tailor P, Tamura T, Kaisho T, Akira S, Ozato K. Induction of an anti-inflammatory cytokine, IL-10, in dendritic cells after toll-like receptor signaling. J Interferon Cytokine Res. 2006 Dec;26(12):893-900.
- 68. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka, K. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol 18: 767-811, 2000.
- 69. Ko-Jiunn Liu. Dendritic Cell, Toll-Like Receptor, and The Immune System. J. Cancer Mol. 2(6): 213-215, 2006
- 70. Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. Nat Rev Immunol. 2004 Jul;4(7):553-64.
- 71. Kokkinopoulos I, Jordan WJ, Ritter MA. Toll-like receptor mRNA expression patterns in human dendritic cells and monocytes. Mol Immunol. 2005 May;42(8):957-68.
- 72. Shin S, Jang JY, Roh EY, Yoon JH, Kim JS, Han KS, Kim S, Yun Y, Choi YS, Choi JD, Kim SH, Kim SJ, Song EY. Differences in circulating dendritic cell

- subtypes in pregnant women, cord blood and healthy adult women. J Korean Med Sci. 2009 Oct;24(5):853-9.
- 73. Williams DL, Ha T, Li C, Kalbfleisch JH, Schweitzer J, Vogt W, Browder IW. Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality. Crit Care Med. 2003 Jun;31(6):1808-18.
- 74. Härter L, Mica L, Stocker R, Trentz O, Keel M. Increased Expression of Toll-Like Receptor-2 and -4 on Leukocytes From Patients With Sepsis. Shock. 2004 Nov;22(5):403-9.
- 75. Mita Y, Dobashi K, Endou K, Kawata T, Shimizu Y, Nakazawa T, Mori M. Toll-like receptor 4 surface expression on human monocytes and B cells is modulated by IL-2 and IL-4. Immunol Lett. 2002 Apr 1;81(1):71-5.
- 76. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection. J Immunol. 2000 Nov 15;165(10):5392-6.
- 77. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. Science. 1999 Jul 30;285(5428):732-6.
- 78. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. Science. 1999 Jul 30;285(5428):736-9.
- 79. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. J Biol Chem. 1999 Jun 18;274(25):17406-9.
- 80. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative

- and gram-positive bacterial cell wall components. Immunity. 1999 Oct;11(4):443-51.
- 81. Armstrong L, Medford AR, Hunter KJ, Uppington KM, Millar AB. Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. Clin Exp Immunol. 2004 May;136(2):312-9.
- 82. Heldrup J, Kalm O, Prellner K. Blood T and B lymphocyte subpopulations in healthy infants and children. Acta Paediatr. 1992 Feb;81(2):125-32.
- 83. Komai-Koma M, Jones L, Ogg GS, Xu D, Liew FY. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Mar 2;101(9):3029-34.
- 84. Dasari P, Nicholson IC, Hodge G, Dandie GW, Zola H. Expression of toll-like receptors on B lymphocytes. Cell Immunol. 2005 Jul-Aug;236(1-2):140-5.
- 85. Thomas RM, Linch DC. Identification of lymphocyte subsets in the newborn using a variety of monoclonal antibodies. Arch Dis Child. 1983 Jan;58(1):34-8.
- 86. Tasker L, Marshall-Clarke S. Functional responses of human neonatal B lymphocytes to antigen receptor cross-linking and CpG DNA. Clin Exp Immunol. 2003 Dec;134(3):409-19.
- 87. Campbell AC, Waller C, Wood J, Aynsley-Green A, Yu V. Lymphocyte subpopulations in the blood of newborn infants. Clin Exp Immunol. 1974 Dec;18(4):469-82.
- 88. Néron S, Nadeau PJ, Darveau A, Leblanc J-F. Tuning of CD40-CD154 interactions in human B-lymphocyte activation: a broad array of in vitro models for a complex in vivo situation. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2011 Feb;59(1):25-40.
- 89. Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression

- of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. Blood. 2003 Aug 1;102(3):956-63.
- 90. Peng SL. Signaling in B cells via Toll-like receptors. Curr Opin Immunol. 2005 Jun;17(3):230-6.
- 91. Dasari P, Zola H, Nicholson IC. Expression of Toll-like receptors by neonatal leukocytes. Pediatr Allergy Immunol. 2011 Mar;22(2):221-8.
- 92. Jain S, Chodisetti SB, Agrewala JN. CD40 signaling synergizes with TLR-2 in the BCR independent activation of resting B cells. PLoS One. 2011;6(6):e20651.
- 93. Minguet S, Dopfer EP, Pollmer C, Freudenberg MA, Galanos C, Reth M, Huber M, Schamel WW. Enhanced B-cell activation mediated by TLR4 and BCR crosstalk. Eur J Immunol. 2008 Sep;38(9):2475-87.