Talita Freitas Manzoli

**“Dosagem de HLA-DR (*Human Leukocyte antigen*
DR) de mononucleares para avaliação de
imunoparalisia em pacientes sépticos na Unidade de
Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP) de um Hospital
Terciário”**

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

Programa de Pediatria

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Juan
Troster

São Paulo

2017

Talita Freitas Manzoli

**“Dosagem de HLA-DR (*Human Leukocyte antigen DR*)
de mononucleares para avaliação de imunoparalisia
em pacientes sépticos na Unidade de Terapia Intensiva
Pediátrica (UTIP) de um Hospital Terciário”**

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

Programa de Pediatria

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Juan
Troster

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Manzoli, Talita Freitas

Dosagem de HLA-DR (*Human Leukocyte antigen DR*) de mononucleares para a avaliação de imunoparalisia em pacientes sépticos na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP) de um hospital terciário / Talita Freitas Manzoli. -- São Paulo, 2017.

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

Orientador: Eduardo Juan Troster.

Descritores: 1.Sepse 2.Choque séptico 3.Antígeno HLA-DR1
4.Antígeno HLA-DR2 5.Monócitos 6.Imunodulação 7.Unidades de terapia
intensiva pediátrica 8.Imunoparalisia

Dedico este trabalho aos pacientes internados
nas diferentes Unidades de Terapia Intensiva
Pediátrica onde trabalho e à minha família.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Eduardo Juan Troster, orientador deste trabalho, agradeço pela confiança, oportunidades e apoio. Obrigada pela paciência e pelas palavras sempre positivas que suprimiram qualquer pensamento desanimador.

À Prof. Dra. Maria Mirtes Salles, chefe do laboratório de citometria de fluxo do Hospital das Clínicas, e à toda a equipe do laboratório de citometria de fluxo, pelo auxílio técnico na análise das amostras e pelos ensinamentos.

À médica Dra. Juliana Ferranti, preceptora dos residentes de Terapia Intensiva, e a todos os residentes de Terapia Intensiva, pelo auxílio na coleta das amostras e na obtenção dos termos de consentimento.

Ao Prof. Dr. Artur Figueiredo Delgado, chefe da UTIP do Instituto da Criança, e a todos os funcionários da UTIP, pelo apoio ao projeto e auxílio na coleta das amostras.

À todas as enfermeiras do laboratório do Instituto da Criança, que realizaram as coletas de amostras dos controles.

Ao Dr. Alexandre Ferraro, pela ajuda no cálculo do tamanho amostral.

Ao Dr. Ulysses Doria Filho, pela ajuda com a análise estatística.

Ao Dr. Eduardo Moura, pela ajuda pela confecção dos gráficos, figuras e revisão deste trabalho.

À todos os meus colegas de trabalho que me deram suporte para poder frequentar as disciplinas de pós graduação e para poder realizar as análises das amostras.

A Mariza Kazue, bibliotecária, que sempre nos ajuda na obtenção de artigos.

E à todos aqueles que me auxiliaram de forma direta ou indireta no decorrer deste trabalho.

Finalmente, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que por meio do processo número 2012/50173-6 concedeu auxílio financeiro para a compra dos materiais necessários para a execução do projeto.

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano”

Isaac Newton

Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1. Introdução -----	1
3.1 Sepses -----	6
3.2 Imunoparalisia -----	8
3.3 a dosagem de HLA-DR -----	9
3.4 Justificativa para realização do projeto -----	11
3.5 Hipótese do estudo -----	11
4. Objetivos -----	12
5. Metodologia -----	13
5.1 Seleção amostral -----	13
5.2 Aspectos éticos -----	14
5.3 Metodologia pré analítica de análise -----	14
5.4 análise por citometria de fluxo -----	15
5.5 análise estatística -----	16
6. Resultados -----	19
7. Discussão -----	27
8. Conclusão -----	31
9. Considerações Finais -----	32
10. Bibliografia -----	33
11. Anexos -----	39
11.1 Primeira página Artigo publicado no Journal of Critical Care.	

11.2 Exemplos de Imagens de citometria de fluxo obtidas.

11.3 Aprovação da CAPPesq.

11.4 Termo de Consentimento Livre e esclarecido dos controles e dos pacientes sépticos.

Lista de Figuras

Figura 1 – Resposta pró e anti-inflamatória normal durante quadro séptico -----	7
Figura 2 – Substâncias codificadas pelo complexo HLA -----	9
Figura 3 – Exemplo de imagem de citometria de fluxo -----	16
Figura 4 – Fluxograma da seleção amostral dos pacientes sépticos -----	19
Figura 5 – Comparação entre o mHLA-DR dos pacientes sépticos na primeira e na segunda coleta, e pacientes controle -----	21
Figura 6 - Δ mHLA-DR mediano dos grupos óbito e sobreviventes -----	23
Figura 7 – Níveis de mHLA-DR nos sobreviventes e óbitos -----	24
Figura 8 – Curva ROC comparando mHLA-DR na primeira coleta, mHLA-DR na segunda coleta e Δ mHLA-DR -----	25

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Definições de SIRS, infecção, sepse, sepse grave e choque séptico conforme recomendações Consenso 2005 -----	2
Tabela 2 – Valores normais de sinais vitais de acordo com a faixa etária e variáveis laboratoriais -----	3
Tabela 3 – Critérios de disfunção orgânica conforme recomendações Consenso 2005 --- -----	3
Tabela 4 – Novos termos e definições para sepse, choque séptico e disfunção orgânica conforme Consenso 2016 -----	4
Tabela 5 – Escore de SOFA -----	5
Tabela 6 - Características clínicas dos pacientes sépticos admitidos na UTIP -----	20
Tabela 7 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes sépticos admitidos a UTIP -----	22
Tabela 8 – Comparação pelo teste de Fisher entre 3 diferentes métodos para detectar pacientes sépticos com maior risco de óbito -----	25

Resumo

Manzoli T. F. Dosagem de HLA-DR (*Human Leukocyte antigen DR*) de mononucleares para avaliação de imunoparalisia em pacientes sépticos na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP) de um Hospital Terciário (Dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo 2017

O presente estudo avaliou a ocorrência de imunoparalisia e sua associação com pior prognóstico em pacientes pediátricos internados em uma UTI de hospital terciário. Para determinar a presença de imunoparalisia procedeu-se a dosagem da expressão de mHLA-DR usando o QuantiBRITE™ *Anti HLA-DR/ Anti- Monocyte*, um novo reagente que padroniza os valores da citometria de fluxo para o mHLA-DR. Determinamos a expressão de mHLA-DR em 30 pacientes com sepse grave ou choque sépticos admitidos na UTI Pediátrica no período do estudo, mHLA-DR foi quantificado por duas vezes: entre os dias 3 a 5 (mHLA-DR1) e 5 a 7 (mHLA-DR2) após o início do quadro séptico. Também foi calculado o Δ mHLA-DR (mHLA-DR2 - mHLA-DR1). Dosamos, ainda, o mHLA-DR em vinte e um controles hígidos. O objetivo do estudo foi determinar se a expressão de mHLA-DR correlaciona-se com a mortalidade em pacientes sépticos pediátricos. Os resultados mostram que o mHLA-DR foi significativamente menor nos pacientes sépticos do que nos controles ($p = 0.0001$). A mortalidade foi de 46% nos pacientes com valores negativos ou < 1000 mAb/cell de Δ HLA-DR, e 7% em pacientes com valores positivos ou > 1000 mAb/cell de Δ HLA-DR. O Δ mHLA-DR médio foi significativamente diferente entre sobreviventes e pacientes que foram a óbito ($p = 0.023$). Dessa forma, após a análise estatística dos resultados concluímos que o Δ HLA-DR correlaciona-se com a mortalidade em pacientes pediátricos com sepse grave e choque séptico.

Descritores: sepse, choque séptico, antígeno HLA-DR1, antígeno HLA-DR2, monócitos, imunomodulação, imunoparalisia.

Abstract

Manzoli T. F. Mononuclear HLA-DR (*Human Leukocyte antigen DR*) dosage for the evaluation of immunoparalysis in pediatric septic patients of a tertiary Intensive Care Unit (PICU) (Dissertation). São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017

This study analysis the presence of Immunoparalysis and its association with prognosis in pediatric septic patients of a Tertiary Intensive Care Unit. To determine the presence of immunoparalysis we performed the mHLA-DR dosage using the QuantiBRITE™ Anti HLA-DR/ Anti- Monocyte, a novel reagent that standardizes flow cytometry values. We determined mHLA-DR expression in 30 patients with severe sepsis or septic shock admitted to PICU, mHLA-DR expression was quantified between days 3–5 and 5–7 after the onset of sepsis and calculated the Δ mHLA-DR (mHLA-DR2 - mHLA-DR1). We also measured mHLA-DR levels in twenty-one healthy patients. The objective of this study was to determine if mHLA-DR values correlate with mortality in pediatric septic patients. The results showed that the mean mHLA-DR expression was significantly lower in septic patients compared with controls ($p = 0.0001$). Mortality was 46% in patients with negative Δ HLA-DR or < 1000 mAb/cell and 7% in patients with positive Δ HLA-DR or > 1000 mAb/cell. Mean Δ mHLA-DR levels were significantly different between survivors and non-survivors ($p = 0.023$). After statistical analysis we concluded that Δ HLA-DR correlates with mortality in pediatric patients with septic shock or severe sepsis.

Descriptors: sepsis, septic shock, , HLA-DR1 antigen, HLA-DR2 antigen, monocyte, immunomodulation, immunoparalysis.

Introdução

1. Seps

Seps é um termo usado para caracterizar infecções generalizadas. O termo seps foi definido pela primeira vez em 1992 em uma conferência entre o *American College of Chest Physicians* e a *Society of Critical Care Medicine*¹. Nesta conferência formou-se o primeiro consenso sobre as definições de seps, seps grave e choque séptico. Neste consenso também definiu-se pela primeira vez o conceito de síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS – *Systemic Inflammatory Response Syndrome*), uma reação inespecífica que ocorre após diversos estímulos e que é regulada por uma complexa interação entre proteínas pró e anti-inflamatórias (citocinas, e quimiocinas) e os componentes linfomonocitários do sangue.

Os conceitos definidos em 1992 foram revistos e em 2005 surgiu um consenso sobre as definições destes termos em pediatria², que estão resumidos nas Tabelas 1 a 3. Em fevereiro de 2016 um novo consenso formulado para a população adulta definiu seps como uma disfunção orgânica potencialmente fatal, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção³, esses novos conceitos estão expressos nas Tabelas 4 e 5 mas ainda necessitam de validação para a população pediátrica.

Tabela 1 – Definições de SIRS, infecção, sepse, sepse grave e choque séptico conforme recomendações Consenso 2005 ²

SIRS

Presença de pelo menos 2 dos seguintes 4 critérios, um dos quais deve ser temperatura anormal ou contagem leucocitária

- Temperatura central $> 38,5^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$
- Taquicardia definida como uma frequência cardíaca média > 2 desvios padrão acima do normal para idade na ausência de estímulos externos, uso crônico de drogas, ou estímulo doloroso, ou outra explicação para a elevação persistente por um período de 0,5 a 4 horas ou para crianças menores de 1 ano: bradicardia definida como uma frequência cardíaca média menor que o percentil 10 para a idade na ausência de estímulo vagal externo, uso de beta-bloqueadores, ou cardiopatia congênita, sendo a depressão na frequência cardíaca persistente e não explicada de outra forma por um período de 0,5 hora.
- Frequência respiratória média > 2 desvios padrão acima do normal para idade OU necessidade de ventilação mecânica por um processo agudo não relacionado a doença neuromuscular ou aplicação de anestesia geral
- Elevação ou redução da contagem leucocitária para idade (excluindo leucopenia induzida pela quimioterapia) OU $> 10\%$ neutrófilos imaturos

Infecção

Infecção suspeita ou confirmada (por cultura positiva, biópsia de tecido, ou teste de reação em cadeia de polimerase) causada por um patógeno OU síndrome clínica associada a alta probabilidade de infecção. Evidência de infecção inclui achados clínicos positivos no exame físico, radiológico ou laboratorial (por exemplo presença de leucócitos em fluido corporal normalmente estéril, radiografia de tórax consistente com pneumonia, erupção cutânea petequial ou purpúrica, ou púrpura fulminans)

Sepse

SIRS na presença ou como consequência de infecção suspeita ou confirmada

Sepse Grave

Sepse mais um dos seguintes: disfunção orgânica cardiovascular OU síndrome do desconforto respiratório agudo OU duas ou mais outras disfunções orgânicas (disfunções orgânicas estão definidas na Tabela 3).

Choque séptico

Sepse e disfunção orgânica cardiovascular como definido na Tabela 3

Tabela 2 – Valores normais de sinais vitais de acordo com a faixa etária e variáveis laboratoriais ²

Idade	Frequência cardíaca				
	Batimentos por minuto				
	Taquicardia	Bradicardia	Frequência respiratória (incursões por minuto)	Contagem leucocitária, (Leucócitosx10 ³ /mm ³)	Pressão arterial sistólica (mmHg)
0 dias a 1 semana	> 180	< 100	> 50	> 34	< 59
1 semana a 1 mês	> 180	< 100	> 40	> 19,5 ou < 5	< 79
1 mês a 1 ano	> 180	< 90	> 34	> 17,5 ou < 5	< 75
2 a 5 anos	> 140	Não se aplica	> 22	> 15,5 ou < 5	< 74
6 a 12 anos	> 130	Não se aplica	> 18	> 13,5 ou < 4,5	< 83
13 a 18 anos	> 110	Não se aplica	> 14	> 11,5 ou < 4,5	< 90

Tabela 3 – Critérios de disfunção orgânica conforme recomendações Consenso 2005 ²

Critérios de disfunção orgânica

Disfunção cardiovascular:

Após receber mais de 40ml/kg de expansão fluidica paciente mantém:

- Redução na pressão arterial abaixo do percentil 5 para idade (hipotensão) ou pressão arterial sistólica 2 desvios padrão abaixo do normal para idade OU
- necessidade de droga vasoativa para manter a pressão arterial em valores normais para a idade OU
- 2 dos seguintes : acidose metabólica inexplicada (*base excess* > 5 mEq/L), aumento de lactato (acima de 2 vezes o limite superior da normalidade), oligúria (< 0,5 mL/kg/hora), aumento do tempo de enchimento capilar (> 5 segundos), diferença entre temperatura central e periférica > 3 °C

Disfunção respiratória

Relação pO₂/FiO₂<300 na ausência de cardiopatia cianogênica ou doença pulmonar crônica prévia, OU

pCO₂ > 65 torr ou 20 mmHg acima da pCO₂ basal, OU

necessidade de FiO₂ > 50% para manter satO₂ > 92%, OU

necessidade de ventilação mecânica invasiva ou não invasiva

Disfunção neurológica

Glasgow < 11 OU

Redução aguda do Glasgow em mais de 3 pontos do padrão basal

Disfunção Hematológica

Plaquetas < 80.000 ou redução maior que 50% do padrão basal OU

International normalized ratio (INR) > 2

Disfunção renal

Creatinina maior que 2x o limite superior para idade, OU

Creatinina 2x maior que o padrão basal do paciente

Disfunção hepática

Bilirrubina total > 4 mg/dl (não aplicável para recém nascidos), OU

Transaminase glutâmico oxaloacética maior que 2x o limite superior para idade

Tabela 4 – Novos termos e definições para sepse, choque séptico e disfunção orgânica conforme Consenso 2016 que avalia parâmetros de pacientes adultos³

Sepse

Disfunção orgânica causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção

Disfunção orgânica

Mudança aguda no score de SOFA (*Sepsis related organ failure Assessment*) de pelo menos 2 pontos em decorrência de infecção (considerar como zero o SOFA basal de pacientes sem disfunção orgânica conhecida pré existente)

qSOFA (quick SOFA)

Ferramenta de triagem que permite avaliação rápida de disfunção orgânica.

Avalia 3 parâmetros: alteração nível de consciência, pressão sistólica ≤ 100 mmHg, ou frequência respiratória ≥ 22 incursões por minuto.

A presença de 2 destes 3 parâmetros identifica pacientes com sepse.

Choque séptico

Tipo de sepse no qual anormalidades circulatórias e metabólico/celulares são profundas o suficiente para aumentar substancialmente a mortalidade.

Podemos identificar pacientes com choque séptico pela sua necessidade de vasopressor para manter pressão arterial média acima de 65 mmHg e por níveis de lactato acima de 2 mmol/L apesar de ressuscitação fluidica adequada.

Tabela 5 – Escore de SOFA ³

Sistema	Escore				
	0	1	2	3	4
Respiratório					
pO ₂ /FiO ₂ mmHg	≥ 400	< 400	< 300	< 200	< 100
Hematológico					
Plaquetas x 10 ³ / μL	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Hepático					
Bilirrubina mg/dL	< 1,2	1,2 a 1,9	2 a 5,9	6 a 11,9	> 12
Cardiovascular					
MAP (Pressão arterial média)	MAP ≥ 70 mmHg	MAP < 70 mmHg	Dopamina < 5 μcg/kg/min ou dobutamina em qualquer dose	Dopamina 5,1 a 15 μcg/kg/min ou epinefrina ≤ 0,1 μcg/kg/min ou norepinefrina ≤ 0,1 μcg/kg/min	Dopamina > 15 μcg/kg/min ou epinefrina > 0,1 μcg/kg/min ou norepinefrina > 0,1 μcg/kg/min
Sistema Nervoso Central					
Escala Glasgow	15	13 - 14	10 -12	6 - 9	< 6
Renal					
Creatinina mg/dL	< 1,2	1,2 - 1,9	2 - 3,4	3,5 - 4,9	> 5
Débito urinário mL/dia	normal	normal	normal	< 500	< 200

Apesar da mortalidade por sepse ter caído de 100% em 1900 para cerca de 50% em 1990, ainda hoje a sepse é a causa mais freqüente de morte em ambientes de Terapia Intensiva Pediátrica, mesmo em países desenvolvidos ^{4,5}.

Nos últimos dez anos, dados epidemiológicos americanos mostram aumento de incidência de 91,3% de sepse nas UTIs daquele país. No estudo de Angus, os autores estimaram no ano de 2000, 750.000 novos casos, a cada ano, com taxa de mortalidade entre 35 e 50% por sepse grave ⁶.

Em sua fase inicial a sepse se caracteriza por uma intensa liberação de mediadores pró-inflamatórios (TNF α , IFN γ , IL1, IL2, IL5, IL7, IL12, IL15, GMCSF), responsáveis por fenômenos como febre, vasodilatação e ativação de polimorfonucleares. Esta resposta é seguida por uma fase anti-inflamatória compensatória (CARS – *Compensatory Anti-Inflammatory response syndrome*) mediada entre outras substâncias pelas IL4, IL6, IL10, IL13, antagonista do receptor de IL1 (IL-1ra) e TGF β ⁷. A inter-relação adequada entre os sistemas pró e anti inflamatórios é o que define uma melhor evolução de quadros sépticos, a persistência por tempo prolongado de uma resposta predominantemente anti-inflamatória levando a um estado patológico de imunodepressão é o que define a imunoparalisia ⁸.

2. Imunoparalisia

Na tentativa de modular a inter-relação entre os sistemas pró e anti inflamatórias nas décadas de 80 e 90, respectivamente, estudos com terapêuticas anti-inflamatórias foram conduzidos visando melhorar a mortalidade relacionada a sepse, porém tais medidas terapêuticas não mostraram benefícios e alguns estudos mostraram, ao contrário do esperado, aumento da mortalidade relacionada ao uso de tais terapêuticas ^{9, 10, 11}.

A partir de então intensificaram-se os estudos a respeito do funcionamento do sistema imune durante a sepse. Observou-se que cerca de 24 horas após a fase pró-inflamatória inicia-se uma resposta anti-inflamatória compensatória (CARS), que pode perdurar por mais tempo do que o esperado e levar a um estado de imunodepressão. Ainda em 1980, os estudos de mortalidade em pacientes politraumatizados demonstraram que a mortalidade tardia destes pacientes em ambiente de UTI se associava a um estado de imunodepressão adquirido, que posteriormente foi denominado imunoparalisia ^{8,12}.

Desta forma, define-se imunoparalisia como uma forma persistente e severa de CARS ^{7, 8, 13, 14}, conforme ilustrado pela Figura 1.

Figura 1 – A – resposta pró e anti-inflamatória normal durante quadro séptico B – resposta pró e anti-inflamatória de paciente com imunoparalisia (Adaptado de Frazier WJ, Hall MW. *Pediatr Clin North Am* 2008 - *Immunoparalysis and adverse outcome from critical illness* ⁸)

A CARS é um fenômeno normal que acontece logo após o início da sepse, na tentativa de recuperar a homeostase do organismo que iniciou um quadro de SIRS. Mas a persistência de uma resposta anti-inflamatória compensatória por tempo prolongado torna-se deletéria, pois compromete quase toda a resposta imune (inata e adaptativa) ^{7, 8, 13}.

Alguns estudos em modelos animais exemplificam bem o padrão bi-modal da resposta inflamatória durante a sepse. Um estudo com antagonista da IL-10 (uma citocina anti-inflamatória), em modelo de indução de sepse mostrou que ao inibir a IL-10 antes do início do quadro séptico ocorre um aumento da mortalidade (provavelmente por um quadro exacerbado de SIRS), enquanto que inibindo a IL-10 12 horas após a indução do quadro séptico ocorre uma redução da mortalidade (provavelmente por evitar um quadro exacerbado de CARS) ¹⁵.

Não existem características clínicas que possam definir pacientes com imunoparalisia, mas existem uma série de características laboratoriais destes pacientes: prejuízo da função neutrofílica global (quimiotaxia, fagocitose e atividade bactericida), hipo-responsividade de linfócitos (dificuldade de proliferação e de produção de citocinas), indução da apoptose de linfócitos, redução dos níveis de citocinas Th1 (IFN- γ) e aumento dos níveis de citocinas Th2 (IL4), níveis elevados de mediadores anti-inflamatórios (IL10, IL-1ra, TGF- β , cortisol), aumento da proporção de linfócitos T reguladores (Treg), desativação monocitária (redução na capacidade de expressão HLA-DR e redução da liberação de citocinas) ¹⁶.

Não existe um exame padrão “ouro” que identifique pacientes com imunoparalisia. Dentre as ferramentas disponíveis para a identificação de tal condição, as mais promissoras são a dosagem da expressão de HLA-DR de monócitos e a dosagem de TNF-alfa após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS). Porém a dosagem de IL-10, a relação entre IL-10/TNF-alfa, dosagens de RNA mensageiro de IL-10 e TNF-alfa, marcadores de apoptose celular como a anexina V e o Bcl-2 também são métodos que estão sendo estudados como possíveis marcadores. Porém a falta de padronização destes métodos e dificuldades técnicas para sua realização tornam-os pouco acessíveis na prática clínica ^{8,16}.

3. A dosagem do HLA-DR

O HLA é o nome dado ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC) em humanos e este complexo tem um papel fundamental na apresentação de antígenos e, portanto, na ativação do sistema imune adaptativo. Ele é produzido por um grupo de genes distribuídos ao longo de uma sequência contínua de DNA do cromossoma 6 ¹⁷.

Os genes do MHC estão organizados em regiões codificantes de três classes de moléculas: genes do MHC classe I, genes do MHC classe II e genes do MHC classe III, respectivamente. Os principais elementos codificados pelo MHC I são os

receptores HLA-A, HLA-B e HLA-C; pelo MHC II são os receptores HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR, e pelo MHC III são as proteínas do complemento, TNF- α , TNF- β ¹⁷, conforme ilustrado pela figura 2 abaixo.

Complexo HLA								
MHC classe	I			II			III	
Região	A	B	C	DP	DQ	DR	C4, C2, BF	
Produto	HLA-	HLA-	HLA-	HLA-	HLA-	HLA-	Proteínas	TNF α
Gênico	A	B	C	DP	DQ	DR	Compleme nto	TNF β

Figura 2 – substâncias codificadas pelo complexo HLA

Em resumo, o HLA-DR é parte do HLA-II presente na membrana de células apresentadoras de antígenos como macrófagos, monócitos e células dendríticas. Ele é essencial para a ativação de linfócitos T helper e sua expressão depende da presença do estímulo antigênico e de uma série de citocinas.

Uma redução na expressão de HLA-DR, portanto, denota uma menor capacidade de ativação do sistema imune adaptativo. A imunoparalisia tem sido caracterizada como uma expressão de HLA-DR < 30% em pacientes sépticos, sua incidência estimada é de 30%, e foi descrita pela primeira vez em 1991 por Volk HD, Thieme M, Heym S et AL ¹³.

Períodos prolongados de redução da expressão do HLA-DR tem se correlacionado em diversos estudos com pior prognóstico na sepse, tendo alguns estudos demonstrado uma mortalidade de 12% em pacientes sépticos com HLA-DR > 30% e de 88% em pacientes sépticos com HLA-DR < 30% ¹⁸.

A dosagem da expressão do HLA-DR é realizada através de citometria de fluxo, porém métodos tradicionais utilizados para esta aferição apresentavam significativos problemas de confiabilidade, ou seja, alterações do tipo de citômetro de fluxo, do ajuste sobre o aparelho e até mesmo a mudança do operador que realiza as mensurações, podem alterar significativamente o resultado ^{19,20}.

A falta de padronização dos métodos de dosagem do HLA-DR impossibilitou por muito tempo a comparação entre diferentes estudos que avaliavam a associação da expressão do HLA-DR com o prognóstico de pacientes com quadros sépticos, e de

estudos que avaliavam o benefício de intervenções terapêuticas na reversão da imunoparalisia.

Em 2005 foi desenvolvido e validado, por meio de um estudo multicêntrico, um método padronizado de dosagem da expressão do HLA-DR de monócitos (mHLA-DR), o método Becton Dickinson (BD) quantiBRITE²¹; este método usa um anticorpo anti-HLADR conjugado em uma proporção de 1:1 com a ficoeritrina (pigmento fluorescente), permitindo a análise de anticorpos ligados por célula (AB-célula), o que evita variações determinadas pela calibração ou pelo tipo de aparelho utilizado para aferição, porém o próprio estudo de validação do método ressalta que a amostra de sangue a ser analisada deve ser estocada de maneira adequada.

Alguns autores definem imunoparalisia utilizando o método BD quantiBRITE como valores de mHLA-DR < 5000 mAb/cel, outros autores usam o valor de < 8000 mAb/cel para identificar pacientes em tal condição, porém até o presente momento não existe um consenso sobre qual valor de mHLA-DR dosado por este método que define imunoparalisia e nem sobre qual o valor normal de mHLA-DR na população em geral^{14, 22, 23, 24}.

4. Justificativa para a realização do presente projeto de pesquisa

Apesar da redução significativa da mortalidade por sepse, por meio de protocolos de tratamento como o “early goal”²⁵ e do desenvolvimento de novas tecnologias de suporte cardiopulmonar, a incidência de quadros sépticos em Unidades de Terapia Intensiva tem aumentado, e a mortalidade por sepse grave ainda é muito alta^{4,5,6}.

A cada dia surgem novas propostas terapêuticas e de monitorização visando reduzir esta mortalidade, e uma das propostas mais promissoras é a modulação do sistema imune. Segundo W. Joshua Frazier e Mark W. Hall “evidências atuais sugerem que a imunoparalisia não é apenas um fenômeno associado a doença crítica mas sim um fenômeno reversível, com impacto benéfico no prognóstico”⁸.

Uma das maneiras de identificar esta entidade é a dosagem de HLA-DR, que até o momento era um método que não permitia análises multicêntricas por falta de reprodutibilidade. Porém com o novo método de dosagem do mHLA-DR estes problemas foram resolvidos^{20,21}, e assim será possível realizar tais comparações assim que forem estabelecidos quais valores de mHLA-DR dosado pelo método QuantiBRITE associam-se com a imunoparalisia, e assim criar critérios para definir

imunoparalisia a fim de, em futuro próximo, serem implementadas medidas terapêuticas visando reverter este estado de imunodepressão e dessa forma, reduzir a alta mortalidade em pacientes sépticos.

5. Hipótese do estudo

Baixas dosagens de mHLA-DR associam-se a pior prognóstico em pacientes pediátricos com sepse grave e choque séptico.

Objetivos

Geral

Estabelecer o perfil de expressão do HLA-DR de monócitos em pacientes com sepse grave ou choque séptico internados na UTI pediátrica do Insituto da Criança (ICr) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Específico

Avaliar se algum dos três métodos é capaz de prever a mortalidade de pacientes com sepse grave e choque séptico: valor de HLA-DR de monócitos entre 3º e 5º dia após o diagnóstico de sepse, valor de HLA-DR de monócitos entre 5º e 7º dia após o diagnóstico de sepse, valor da subtração entre HLA-DR de monócitos na segunda e na primeira amostra.

Analisar qual o melhor método no diagnóstico de imunoparalisia entre três métodos: valor de HLA-DR de monócitos entre 3º e 5º dia após o diagnóstico de sepse, valor de HLA-DR de monócitos entre 5º e 7º dia após o diagnóstico de sepse, valor da subtração entre HLA-DR de monócitos na segunda e na primeira amostra.

Correlacionar a associação de imunoparalisia com fatores preditivos de desfecho desfavorável (dias livres de ventilação mecânica e dias livre de drogas vasoativas).

Avaliar a associação de imunoparalisia com infecções secundárias.

Metodologia

1- Seleção amostral

Foi realizado um estudo de Coorte prospectivo para definir a expressão do mHLA-DR e a incidência de imunoparalisia nos pacientes com sepse grave ou choque séptico (segundo as definições estabelecidas pela conferencia de 2005)² que estiveram internados na UTI pediátrica do ICr (UTIP) no período do estudo.

Incluímos todos os pacientes internados na UTIP no período do estudo e que tinham o diagnóstico de sepse grave ou choque séptico. Excluímos do estudo pacientes com choque séptico que vieram a óbito em menos de 48h após a admissão na UTI, pacientes com falência hepática terminal, pacientes em cuidados paliativos, pacientes com suspeita de morte encefálica, pacientes admitidos após parada cardíaca, pacientes com leucopenia grave (menos de 500 neutrófilos por mm³), pela dificuldade técnica de isolar os monócitos dessas amostras, pacientes com imunodeficiência primária, pacientes cujos responsáveis legais não concordaram em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido e pacientes que já haviam participado do estudo.

Foi realizado o cálculo do tamanho amostral necessário, admitindo-se um erro alfa de 5%, um poder de estudo de 80%, uma prevalência de exposição de 30%, uma mortalidade no grupo com HLA-DR < 5000 AB/cel de 80%, e uma mortalidade no grupo com HLA-DR >5000 AB/cel de 15%, a amostra necessária para esta comparação seria de 25 pacientes sépticos.

Para selecionar os pacientes, o pesquisador responsável pelo projeto entrava em contato aos domingos, terças e quintas feiras em um período sequencial de cinco meses com os médicos residentes da Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica e estes informavam se havia algum paciente com sepse grave ou choque séptico internado segundo as definições da Conferência de 2005². O pesquisador responsável avaliava então se estes pacientes preenchiam os critérios de inclusão e exclusão do estudo e programava a data da coleta das amostras de todos os pacientes que preenchessem os critérios de inclusão.

Os pacientes foram acompanhados por quarenta e cinco dias ou até a alta da UTI, eles foram divididos em dois grupos: “óbito” ou “sobreviventes”. Sendo que o segundo grupo incluiu pacientes que receberam alta da UTI e pacientes que

permaneciam vivos após quarenta e cinco dias de internação, mas que ainda estavam internados na UTIP do ICr após este período. Foi estabelecido este limite de quarenta e cinco dias para seguimento porque alguns pacientes internados em nossa unidade permanecem internados por longos períodos mesmo após resolução do quadro séptico.

Adicionalmente, foram analisadas amostras de sangue de pacientes controle pediátricos cujos responsáveis legais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido concordando em participar do estudo, estes pacientes não apresentavam diagnóstico conhecido de qualquer imunodeficiência, não faziam uso de qualquer substância imunossupressora e também não apresentavam infecção ativa na época da realização do exame.

Os pacientes controle necessitavam de coleta de sangue para exames de rotina solicitados ambulatorialmente, foram selecionados aleatoriamente como uma amostra de conveniência, eram pacientes que estavam no laboratório na data em que o pesquisador responsável se encontrava no hospital para analisar amostras de pacientes sépticos. A amostra para dosagem do mHLA-DR dos controles foi obtida juntamente com os exames que o paciente coletaria de rotina, não sendo necessária punções adicionais.

Também foram avaliados e registrados os dados dos prontuários dos pacientes sépticos incluídos no estudo e dos pacientes controle, seguindo os protocolos éticos estabelecidos.

2- Aspectos éticos

Projeto aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) em fevereiro de 2012, registro on-line número 8389, todos os responsáveis legais dos pacientes sépticos e pacientes controle incluídos no estudo assinaram termo de consentimento livre e esclarecido

3- Metodologia pré-analítica de obtenção amostral

Em pacientes sépticos o sangue foi coletado entre o 3º e o 5º dia após o diagnóstico de sepse grave ou choque séptico (período esperado de pico da CARS), e uma nova amostra foi obtida 2 a 4 dias após a primeira (período em que já se espera uma recuperação da resposta imune). Todas as coletas foram realizadas juntamente com a coleta dos exames de rotina do paciente, não sendo necessário punção adicional para realização do exame.

Nos controles foi coletada apenas 1 amostra de sangue juntamente com a coleta dos exames de rotina solicitados ambulatorialmente para o paciente, não sendo necessário punção adicional para realização do exame.

Para dosagem do mHLA-DR foi coletado um mililitro de sangue dos pacientes sépticos e controles por punção venosa periférica ou através de cateter venoso ou arterial. A amostra foi armazenada em tubo de EDTA e foi estocada em geladeira a 4°C, sendo transportada para o laboratório de citometria de fluxo em isopor fechado e com gelo pelo pesquisador principal, o tempo entre a coleta e a análise de todas as amostras foi menor que oito horas, o que não altera significativamente a expressão do mHLA-DR ^{21,26}.

4- Análise por citometria de fluxo do mHLA-DR

A dosagem do mHLA-DR foi realizada pelo pesquisador principal por citometria de fluxo, no laboratório de hematologia do Instituto Central do Hospital das Clínicas, usando um citômetro da marca FACSCalibur, e o reagente QuantiBRITE™ Anti HLA-DR/ Anti- Monocyte, fornecido pela empresa Becton Dickinson (BD) e financiado por verba da FAPESP.

Este reagente contém dois anticorpos monoclonais: o Anti-Monocyte PerCP-Cy5.5, este anticorpo liga-se as proteínas CD14 e CD64 presentes na superfície de praticamente todos os monócitos, permitindo quantificar o número de monócitos na amostra; e o anticorpo monoclonal anti-HLA-DR, ligado a um pigmento fluorescente, a fico-eritrina, na proporção de 1:1. A presença do pigmento fluorescente ligado em proporção conhecida ao anti HLA-DR permite estimar o número de receptores de HLA-DR por célula (AB/cell).

O procedimento técnico para a realização da dosagem do mHLA-DR seguiu as orientações do fabricante e de Döcke WD et al²¹. Em resumo 50 µL de sangue total foram misturados com 20 µL do reagente QuantiBRITE™ Anti HLA-DR/ Anti-Monocyte, a amostra foi então estocada por 30 minutos em temperatura ambiente, no escuro. Após este período 450 µL de solução de FACS Lysing foi adicionada à amostra, que foi homogeneizada e estocada por 20 minutos em temperatura ambiente, no escuro. Após a lise da amostra foram adquiridos 5.000 monócitos/evento no citômetro previamente calibrado com o BD Calibrite™ 3 BEADS/ FACSCComp™. O software BD CellQuest foi usada para aquisição dos dados e análises.

O resultado ficou disponível para equipe médica que estava acompanhando clinicamente o paciente.

A figura 3 abaixo mostra um exemplo de imagens obtidas através da análise de nossas amostras por meio de citometria de fluxo.

Figura 3 – Imagem de citometria de fluxo da seleção dos monócitos em vermelho e da imunofluorescência do Anti-HLA-DR PE em verde.

5- Análise estatística

Foi realizada a comparação da expressão do mHLA-DR dos pacientes sépticos, com o mHLA-DR dos pacientes controle. Entre os pacientes sépticos foi feita a comparação entre o mHLA-DR do grupo óbito e do grupo sobreviventes, e também entre o mHLA-DR do grupo que desenvolveu infecção secundária e o grupo que não desenvolveu infecção secundária. Para tais comparações, foi usado o teste de Mann-Whitney considerando um nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

Outra análise que realizou-se foi da variação do mHLA-DR entre a primeira e a segunda coleta (Δ mHLA-DR), para isto calculamos a diferença do mHLA-DR entre a segunda e a primeira amostra ($\text{mHLA-DR}_2 - \text{mHLA-DR}_1$) para cada paciente, e então comparou-se o Δ mHLA-DR dos pacientes do grupo sobreviventes com o Δ mHLA-DR dos pacientes do grupo óbito, e também fora comparado o Δ mHLA-DR dos pacientes do grupo sem infecção secundária com o Δ mHLA-DR dos pacientes do grupo com infecção secundária. Para esta comparação também utilizou-se o teste de Mann-Whitney considerando um nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

As correlações entre as variáveis avaliadas foram determinadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. Especificamente avaliou-se a correlação do mHLA-DR e do Δ mHLA-DR com os escores de risco de mortalidade pediátricos (Pediatric Index of Mortality 2 [PIM-2]²⁷ e Pediatric Risk of Mortality [PRISM]²⁸), desfechos secundários (dias livres de ventilação mecânica e dias livres de drogas vaso-ativas), contagem total de leucócitos e linfócitos dosados concomitantemente com o mHLA-DR.

Foi utilizado o teste de Mann-Whitney ($p < 0.05$) para avaliar a associação entre mortalidade e os seguintes desfechos secundários: escores de risco de mortalidade pediátrica (PIM 2/ PRISM), idade, tempo de permanência na UTIP, contagem total de leucócitos e linfócitos entre 3º e o 5º dia após o diagnóstico de sepse grave ou choque séptico, e contagem total de leucócitos e linfócitos dois a quatro dias após a primeira amostra.

O teste de Mann-Whitney foi escolhido para nossa análise pois ele é um teste não paramétrico que avalia variáveis independentes que não tem uma distribuição gaussiana, como ocorre em nossa amostra. A escolha do teste de correlação de Spearman também se deve a sua aplicação para estabelecer correlação entre variáveis não paramétricas.

Para a comparação do risco de morte (inferido pela razão de riscos – OR) em pacientes sépticos com imunoparalisia e sem imunoparalisia, testes de regressão logística com intervalo de confiança de 95% foram realizados, para isto utilizou-se o *software* “Epi Info (TM) 3.5.1 - Database and statistics software for public health professionals”.

Foi construída uma curva “*receiver operating characteristic*” (curva ROC) para determinar o melhor método para predizer a mortalidade entre: o Δ mHLA-DR, mHLA-DR na primeira amostra de sangue (HLA d3-5), e mHLA-DR na segunda amostra de sangue (HLA d5-7).

As curvas ROC são uma forma de representar a relação, normalmente antagônica, entre a sensibilidade e a especificidade de um teste diagnóstico quantitativo. Para construir uma curva ROC, traça-se um diagrama que represente a sensibilidade em função da proporção de falsos positivos (1- Especificidade). As curvas ROC permitem quantificar a exatidão de um teste diagnóstico, já que, esta é proporcional à área sob a curva ROC, isto é, tanto maior quanto mais a curva se aproxima do canto superior esquerdo do diagrama.

Também foi feita a comparação pelo teste de Fisher entre três diferentes métodos para detectar pacientes sépticos com maior risco de óbito: $\Delta\text{mHLA-DR} < 1000 \text{ mAb/cell}$, $\text{mHLA-DR} < 5000 \text{ mAb/cell}$ em qualquer amostra, e $\text{mHLA-DR} < 8000 \text{ mAb/cell}$ em qualquer amostra.

Foi utilizado o teste de Fisher pois ele permite a avaliação da capacidade dos métodos em predizer a mortalidade mesmo com amostras de pequeno tamanho, como é o caso de nosso trabalho.

Resultados

Dentre os trinta pacientes sépticos incluídos no estudo, vinte e sete tiveram duas dosagens de mHLA-DR e três receberam alta da UTI antes da coleta da segunda amostra de sangue. Adicionalmente, foram coletadas amostras de vinte e um pacientes controle. A Figura 4 abaixo é um fluxograma que demonstra como foi realizada a seleção amostral dos pacientes sépticos.

Figura 4 – fluxograma da seleção amostral dos pacientes sépticos

Não houveram diferenças significantivas entre a idade e o gênero dos pacientes sépticos e dos controles. ($p = ns$). Também não houveram diferenças significantes

entre idade e valores de mHLA-DR dentro do grupo controle e dentro do grupo com sepse ($p = ns$).

Comparando os pacientes sépticos sobreviventes e pacientes sépticos que foram a óbito a Tabela 6 mostra as principais características clínicas dos pacientes sépticos incluídos em nosso estudo.

Tabela 6 - Características clínicas dos pacientes sépticos admitidos na UTIP do HCFMUSP, São Paulo, Brasil, entre janeiro de 2013 e fevereiro de 2015 que foram incluídos no estudo

metastases no estado			Sobreviventes	Óbitos
			(n=23)	(n=7)
Gênero			65% meninos	57% meninos
			35% meninas	43% meninas
Fonte primária de infecção	de		43% pulmonar	57% pulmonar
			21% hematológica	14% hematológica
			17,3% abdominal	14% abdominal
			13% pele	14% urinária
			4% urinária	
Patologia de base			30% neurológicas	42% neurológicas
			26% trato gastro-intestinal	14% trato gastro-intestinal
			26% onco-hematológicas	14% imunológicas
			4,3% imunológicas	14% pulmonar
			13,7% outras	14% metabólica

A expressão mediana do mHLA-DR foi significativamente maior nos controles do que nos pacientes com sepse grave e choque séptico (teste Mann-Whitney, $p < 0.0001$). Conforme demonstrado pela figura 5 abaixo.

Figura 5 – Comparação entre o mHLA-DR dos pacientes sépticos na primeira coleta (HLA d3-5), pacientes sépticos na segunda coleta (HLA d5-7), e pacientes controle (HLA controles).

A mortalidade foi de 23% nos pacientes com sepse grave e choque séptico. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada na comparação entre os grupos óbito e sobreviventes com relação aos seguintes parâmetros: idade, escores de gravidade (PIM2 e PRISM) e tempo de permanência em UTIP (teste Mann-Whitney = ns, todos).

No entanto, o número de dias livres de ventilação mecânica e o número de dias livres de drogas vasoativas foi menor no grupo óbito do que no grupo sobreviventes (teste Mann-Whitney com $p = 0.004$ e $p = 0.04$ respectivamente).

Não houveram correlações entre a expressão de mHLA-DR ou Δ mHLA-DR e os escores de gravidade (PIM 2 e PRISM) ($r_s = \text{ns}$, all). De forma similar, nenhuma correlação significativa foi encontrada entre mHLA-DR ou Δ mHLA-DR e dias livres de ventilação mecânica, ou tempo de permanência em UTIP ($r_s = \text{ns}$, all).

O Δ mHLA-DR se correlacionou com os dias livres de drogas vasoativas ($r_s = 0.481$, $p = 0.015$).

A contagem total de leucócitos e linfócitos, e a diferença entre a contagem total de linfócitos entre a segunda e a primeira amostra de sangue (Δ CTL), não foram significativamente diferentes entre os grupos óbito e sobreviventes (Mann-Whitney =

ns, todos), conforme pode se observar na Tabela 7, e também não se correlacionaram com nenhuma variável avaliada, incluindo o Δ mHLA-DR (r_s = ns, todos).

Tabela 7 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes sépticos admitidos a UTIP do HCFMUSP, São Paulo, Brasil, entre janeiro de 2013 e fevereiro de 2015 que foram incluídos no estudo.

	Sobreviventes	Óbitos	p (Mann Withney)
	(n=23)	(n=7)	
Idade mediana	99 (IQR 69,5)	28,5 (IQR 51,9)	0,053
(meses)			
PIM 2 mediano	5,9 (IQR 19,2)	26,8 (IQR 64,9)	0,078
PRISM mediano	5,3 (IQR 11,2)	15,9 (IQR 51,3)	0,48
Mediana do total	10600 (IQR 7375)	13900 (IQR 8042)	0,27
de leucócitos d3-5			
Mediana do total	10845 (IQR 5858)	13500 (IQR 7657)	0,525
leucócitos d5-7			
Mediana do total	1604 (IQR 3209)	1580 (IQR 1760)	0,75
linfócitos d3-5			
Mediana do total	1846 (IQR 2281)	2660 (IQR 4044)	0,698
linfócitos d5-7			
Mediana delta	436 (IQR 1969)	- 326 (IQR 3086)	0,782
linfócitos			

*IQR = inter quartil range

Um total de 48% dos pacientes (13/27), não mostrou aumento significativo no valor de mHLA-DR entre a primeira e a segunda amostra de sangue (mHLA-DR caiu resultando em um valor negativo de Δ mHLA-DR ou aumentou menos do que < 1000 mAb/cell). Neste grupo de pacientes a mortalidade foi de 46%, enquanto que no grupo com aumento > 1000 mAb/cell de Δ mHLA-DR a mortalidade foi de 7%. Adicionalmente, efetuando-se o cálculo entre a razão de chances (odds ratio – OR) e a mortalidade destes dois grupos de pacientes (Δ mHLA-DR > 1000 AB/cell *versus* Δ mHLA-DR < 1000 AB/cell), teremos OR = 7.5 (95%CI: 1.09–51.54). Podemos observar na figura 7 valores ascendentes de mHLA-DR no grupo de pacientes sobreviventes e valores descendentes de mHLA-DR no grupo óbitos.

O Δ mHLA-DR mediano foi significativamente diferente entre os grupos óbito e sobreviventes (teste Mann-Whitney com $p = 0.023$), como pode ser visualizado na figura 6, e o Δ mHLA-DR pode ser útil em prever a mortalidade de pacientes com sepse grave e choque séptico. No entanto nenhum valor de corte de mHLA-DR na primeira amostra (mHLA-DR d3-5) ou na segunda amostra (mHLA-DR d5-7) poderia ser utilizado para prever a mortalidade, conforme demonstrado na figura 7.

Figura 6 - Δ mHLA-DR mediano dos grupos óbito e sobreviventes

Figura 7 – níveis de mHLA-DR nos sobreviventes em azul, óbitos em rosa, na primeira coleta (d3-5) com listras diagonais, na segunda coleta (d5-7) sem listras.

A Figura 7 mostra que pacientes que receberam alta da UTIP ou que sobreviveram após 45 dias de hospitalização, tiveram uma ascensão dos níveis de expressão de mHLA-DR entre a primeira e a segunda amostra de sangue, enquanto que os pacientes que foram a óbito eventualmente apresentavam níveis descendentes de mHLA-DR.

De acordo com a análise da curva ROC, ilustrada na figura 8, o melhor método para prever a mortalidade é o Δ mHLA-DR.

Figura 8 – curva ROC comparando mHLA-DR na primeira coleta, mHLA-DR na segunda coleta e Δ mHLA-DR.

O teste de Fisher também comprova que o Δ mHLA-DR foi o único método capaz de predizer a mortalidade dentre os 3 métodos avaliados, conforme demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8 – Comparação pelo teste de Fisher entre 3 diferentes métodos para detectar pacientes sépticos com maior risco de óbito: Δ mHLA-DR < 1000 mAb/cell, mHLA-DR < 5000 mAb/cell, e mHLA-DR < 8000 mAb/cell.

	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Valor preditivo positivo (VPP) (%)	Valor preditivo negativo (VPN) (%)	Teste de Fisher (p)
ΔmHLA-DR	85.7	65	46.1	92.8	0.0329*
< 1000 mAb/cell	(IC 95% 42.1 a 99.6)	(IC 95% 40.7 a 99.6)	(IC 95% 19.2 a 74.8)	(IC 95% 66.1 a 99.8)	
mHLA-DR	14.2	95	50	76	0.4587
< 5000 mAb/cell	(IC 95% 0.3 a 57.9)	(IC 95% 75.1 a 99.8)	(IC 95% 1.2 a 98.7)	(IC 95% 54.8 a 90.6)	
mHLA-DR	28.5	60	20	70.5	0.6784
< 8000 mAb/cell	(IC 95% 3.6 a 70.9)	(IC 95% 36 a 80.8)	(IC 95% 2.5 a 55.6)	(IC 95% 44 a 89.6)	

* estatisticamente significante ($p < 0.05$)

Um total de 64% (n=17) de pacientes apresentou infecção secundária seguindo as definições do CDC/NHSN (*Center for Disease Control's National Healthcare Safety Network*), incluindo 6 dos 7 pacientes que foram a óbito. Nesta coorte de pacientes com infecção secundária, 56% tiveram como causa desta infecção um dispositivo invasivo presente por tempo prolongado. Excluindo-se os pacientes que foram a óbito, o número de pacientes com infecção secundária proveniente de dispositivo invasivo chega a 90%. A mediana do mHLA-DR d3-5 , do mHLA-DR d5-7, e do Δ mHLA-DR não foi estatisticamente significativa entre os pacientes com e sem infecção secundária (teste Mann Whitney $p=0,139$; $p= 0,579$; $p= 0,824$ respectivamente).

Discussão

Em nosso estudo foi encontrada uma associação entre os valores de Δ mHLA-DR e a mortalidade por sepse grave e choque séptico em pacientes pediátricos. Mas não foi possível identificar um valor de corte de mHLA-DR que conseguisse prever essa mortalidade. Estudos sobre a associação entre a expressão de mHLA-DR e os desfechos de pacientes em terapia intensiva mostram resultados divergentes: alguns estudos não encontraram associação entre valores de mHLA-DR com a mortalidade^{22, 29, 30, 31}, assim como ocorreu em nosso estudo; mas outros estudos encontraram uma associação entre valores de mHLA-DR e mortalidade^{32, 33, 34}.

Estes resultados conflitantes podem estar relacionados aos diferentes métodos usados para quantificação do mHLA-DR e aos diferentes intervalos para análise da amostra, ambos fatores podem afetar significativamente os resultados.

A dosagem de mHLA-DR foi utilizada em nosso estudo em detrimento aos outros métodos para avaliação de imunoparalisia por diversos motivos, dentre os quais podem-se destacar: o mHLA-DR é classicamente usado para definir se o paciente apresenta ou não imunoparalisia, o mHLA-DR não exige análise imediata da amostra e nem congelamento em nitrogênio líquido sendo portanto acessível para a prática diária, existe um método padronizado e validado de dosagem de mHLA-DR da Becton Dickinson (BD), o que permite análises multicêntricas, o que não ocorre, por exemplo, com a dosagem de TNF-alfa após estímulo com lipopolissacarídeos (LPS), que pode ser feita com diferentes cepas de LPS e em diferentes concentrações.

Neste estudo usamos o reagente QuantiBRITE™ Anti HLA-DR/ Anti-Monocyte da BD para quantificar a expressão de mHLA-DR de monócitos. Este método foi validado em um protocolo de pesquisa multicêntrico que padroniza o uso deste reagente²¹, que tem como vantagem não ter seus resultados afetados pelo tipo de citômetro, calibração do citômetro, parâmetros do sistema, lote de anti-corpo e operador que está realizando a dosagem^{20, 21}. Infelizmente os dados obtidos utilizando-se o QuantiBRITE™ Anti HLA-DR/ Anti-Monocyte não evidenciaram boa correlação quando analisados lado a lado com o reagente tradicional, usado para aferir a porcentagem de monócitos que expressam mHLA-DR. As amostras não foram

submetidas a avaliação do mHLA-DR por ambos os métodos e não está evidente qual dos dois métodos é mais recomendado para prever o desfecho do paciente^{20, 35}.

Salienta-se que este é o primeiro estudo que utilizou o reagente QuantiBRITE™ Anti HLA-DR/ Anti- Monocyte para quantificar a expressão de HLA-DR de monócitos em pacientes sépticos pediátricos e apenas um estudo consultado nas bibliografias disponíveis utilizou este método para prever a mortalidade em pacientes adultos com sepse, mas este estudo também não demonstrou correlação entre dosagens de mHLA-DR e o desfecho clínico³⁶. Portanto não existem, até o desfecho experimental deste trabalho, valores sobre HLA-DR de monócitos que definam imunoparalisia por meio deste método, sendo este um dos objetivos anteriores deste estudo.

Se considerarmos imunoparalisia como um estado em que mHLA-DR < 5000 mAb/cell ou 8000 mAb/cell, como proposto em alguns estudos com adultos^{14, 22, 23, 24}, apenas 7.4% dos pacientes em nossa amostra estariam em imunoparalisia com o primeiro limite, e 29% com o valor de < 8000 mAb/cell. Os valores mais elevados de mHLA-DR em nosso estudo podem estar relacionados ao montante de reagente utilizado (20 µL de reagente para 50 µL de sangue total, como recomendou o fabricante) para garantir que os receptores de HLA-DR dos monócitos fossem totalmente saturados com o seu anticorpo monoclonal. Por outro lado, estes valores mais elevados de mHLA-DR podem ser uma característica de crianças com imunoparalisia, o que pode refletir a necessidade de limites diferentes de mHLA-DR para diferentes faixas etárias, e mais pesquisa com pacientes pediátricos é necessária para elucidar esta questão.

Considerando a definição mais ampla de imunoparalisia, que seria a incapacidade de restaurar a homeostase entre os sistemas pró e anti-inflamatório e a persistência de CARS prolongada^{7, 8, 13, 14}, o que pode ser identificado por valores estáticos ou regressivos de mHLA-DR após o pico da resposta anti-inflamatória (entre o 3º e o 5º dia após o início do quadro séptico^{8, 14, 37 a 39}), 43% dos pacientes em nossa amostra apresentavam imunoparalisia, pois dez pacientes tiveram níveis decrescentes de mHLA-DR entre a primeira e a segunda amostra de sangue e três tiveram mudanças na expressão de mHLA-DR menores do que 1000 mAb/cell entre as duas amostras.

Neste estudo, a incapacidade do sistema mononuclear em aumentar os níveis de expressão de mHLA-DR em pacientes com sepse grave e choque séptico, que poderia ser um indicativo de imunoparalisia, correlacionou-se positivamente com a

mortalidade ($p = 0.023$). Achados similares foram relatados em outras pesquisas com pacientes adultos^{33, 40-42}. Nossos resultados sugerem que o Δ mHLA-DR é o melhor método para detectar pacientes sépticos com maior risco de óbito do que qualquer valor de mHLA-DR como evidenciado pelo teste de Fisher e pela curva ROC.

O Δ mHLA-DR se correlacionou positivamente com os dias livres de drogas vasoativas, indicando que a sepse foi mais grave em pacientes que não apresentaram valores ascendentes de mHLA-DR, o que também é consistente com imunoparalisia^{33, 34, 40, 41}.

Na amostra avaliada neste trabalho, tanto o mHLA-DR, quanto o Δ mHLA-DR não foram capazes de prever o desenvolvimento de infecção secundária, o que não é consistente com outros estudos sobre imunoparalisia^{43, 44}, mas a maior parte dos pacientes de nossa amostra que desenvolveu infecção secundária tinha um importante fator de risco, a presença de dispositivo invasivo por mais do que 30 dias, o que pode gerar um viés, colocando a presença de imunoparalisia como fator de risco para infecção secundária em segundo plano.

Não foi possível investigar a associação entre a expressão de mHLA-DR ou Δ mHLA-DR e o uso de claritromicina, dopamina, metoclopramida, imunoglobulina, imunossuppressores, corticóides, filgastrima, e hemodiálise devido ao maior tamanho amostral necessário para tal investigação.

Algumas limitações deste estudo são: pequeno tamanho amostral, já que quando calculamos a amostra necessária para o estudo tivemos como parâmetro de cálculo valores de mortalidade de estudos prévios em adultos com e sem imunoparalisia, e esses valores se mostraram mais baixos em paciente pediátricos. Em outras palavras, em adultos a mortalidade estimada de pacientes sépticos com imunoparalisia é de 80%, enquanto que em nossos pacientes pediátricos com imunoparalisia a mortalidade encontrada foi de 46%, e em pacientes adultos sem imunoparalisia a mortalidade estimada é de 15%, enquanto que em nossos pacientes pediátricos sem imunoparalisia a mortalidade encontrada foi de 7%. Re-calculando o tamanho amostral ideal para manter um erro alfa de 5% e um poder de estudo de 80% nossa amostra deveria ter 33 pacientes sépticos.

Esse menor tamanho amostral também prejudica a aquisição da curva ROC e a determinação do melhor valor de corte de Δ mHLA-DR para definir imunoparalisia.

Outras limitações de nosso estudo foram os diferentes períodos entre a coleta da amostra e as análises e a heterogeneidade de nossa população.

Nossos resultados indicam que medidas seriadas usando o reagente QuantiBRITE™ Anti HLA-DR/ Anti- Monocyte podem ser de maior valor prognóstico do que dosagem única de mHLA-DR, especialmente após o 3º dia de diagnóstico de sepse grave ou choque séptico (período de pico da resposta anti-inflamatória compensatória), e que o Δ mHLA-DR pode ser usado para identificar pacientes com risco de imunoparalisia.

Finalmente, a contagem total de linfócitos e leucócitos não é preditiva de imunoparalisia, pois ela não se correlaciona com os valores de Δ mHLA-DR. Também não foi encontrada associação entre a contagem total e diferencial de leucócitos e mortalidade. Estes achados apoiam a necessidade de se estabelecer um método padronizado para reconhecer pacientes com maior risco de imunoparalisia, que é uma complicação da sepse grave e do choque séptico.

Conclusão

Em nosso estudo a expressão de HLA-DR de monócitos dos pacientes com sepse grave e choque séptico é significativamente menor que de pacientes controles.

O Δ HLA-DR foi o único método capaz de prever a mortalidade de pacientes sépticos dentre os seguintes: valor de HLA-DR de monócitos entre 3º e 5º dia após o diagnóstico de sepse, valor de HLA-DR de monócitos entre 5º e 7º dia após o diagnóstico de sepse, valor da subtração entre HLA-DR de monócitos entre a segunda e primeira coleta (Δ HLA-DR).

Dessa forma, este estudo sugere a utilização do Δ HLA-DR como uma das possíveis ferramentas para o diagnóstico de imunoparalisia e para a identificação de pacientes com maior risco de óbito, em outras palavras sugere-se a utilização do Δ HLA-DR como ferramenta de determinação do prognóstico de quadros de sepse.

Pacientes com imunoparalisia definida por baixos valores de Δ HLA-DR além de terem uma maior mortalidade também tiveram menos dias livres de drogas vasoativas em nosso estudo, não houve associação de dias livres de ventilação mecânica ou tempo de internação em UTI com a presença de imunoparalisia ou com qualquer valor de HLA-DR de monócitos.

Não houve associação de valores HLA-DR de monócitos ou Δ HLA-DR com infecção secundária, porém outras variáveis envolvidas podem ter gerado este viés neste resultado.

Considerações Finais

Uma das propostas mais promissoras para reduzir a mortalidade por sepse grave e choque séptico é a modulação do sistema imune. Imunoparalisia é uma entidade que se associa a pior prognóstico em quadros de sepse.

Mais estudos são necessários para que se possa definir qual a melhor ferramenta para o diagnóstico de imunoparalisia em pediatria.

Espera-se que em um futuro próximo, após estabelecidos os parâmetros para o diagnóstico de imunoparalisia, possa-se desenvolver medidas para reverter este fenômeno, o que possivelmente resultaria em um impacto benéfico no prognóstico de pacientes com sepse grave e choque séptico.

Bibliografia

1. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee: ACCP/SCCM Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med, 1992;20:864-874
2. Goldstein B, Giroir B, Adrienne R, Members of the International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. Pediatric Critical Care Medicine. 6(1):2-8, January 2005
3. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA February 23, 2016 Volume 315, Number 8
4. Stoll BJ, Holman RC, Schuchat A. Decline in sepsis-associated neonatal and infant deaths in the United States, 1979 through 1994. Pediatrics 1998; 102:e18.
5. Watson RS, Carcillo JA, Linde-Zwirble WT, Clermont G, Lidicker J, Angus DC. The epidemiology of severe sepsis in children in the United States. Am J Respir Crit Care Med 2003; 167:695–701.
6. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR - Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care - Crit Care Medicine 2001 Jul;29(7):1303-10.
7. Carcillo JA - Critical Illness Stress-induced Immune Suppression - Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine, Volume 2007, Part 4, 217-228.
8. Frazier WJ, Hall MW. Immunoparalysis and Adverse Outcomes from Critical Illness - Pediatr Clin North Am. 2008 June ; 55(3): 647–xi.
9. Bone RC, Balk RA, Fein AM, Peri TM, Wenzel RP, Reines HD, et al. A second large controlled clinical study of E5, a monoclonal antibody to

- endotoxin: results of a prospective, multicenter, randomized, controlled trial. The E5 Sepsis Study Group. Crit Care Med Jun;1995 23(6):994–1006
10. Opal SM, Fisher CJ Jr, Dhainaut JF, Vincent JL, Brase R, Lowry SF, et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. Crit Care Med Jul;1997 25(7):1115–1124.
  11. Cohen J, Carlet J. INTERSEPT: an international, multicenter, placebo-controlled trial of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor-alpha in patients with sepsis. International Sepsis Trial Study Group. Crit Care Med Sep;1996 24(9):1431–1440.
  12. Polk HC Jr, Welhausen SR, Regan M. A systematic study of host defense processes in badly injured patients - Ann Surg 1986;204(3):282-97.
  13. Volk HD, Thieme M, Heym S, Docke WD, Ruppe U, Tausch W, et al. Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease- predictive value and new therapeutic strategies – Behring Inst Mitt 1991, 208-215.
  14. Monneret G, Debard AL, Venet F, Bohe J, Hequet O, Bienvenu J, et al - Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis.- Crit Care Med. 2003 Jul;31(7):2068-71.
  15. Kalechman Y, Gaftor U, Gal R et al. Anti-IL-10 therapeutic strategy using the immunomodulator AS101 in protecting mice from sepsis-induced death. *J Immunol* 2002;**169**:384–92
  16. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA – Imunologia de Kuby, 6a edição, editora artmed, 2008 pg32-41.
  17. How to identify Sitemic Sepsis-Induced Immunoparalysis , Guillaume Monneret, Advances in sepsis vol4, number 2, 2005
  18. Volk HD, Reinke P, Krausch D, Zuckermann H, Asadullah K, Müller JM, et al. Monocyte deactivation rationale for a new therapeutic strategy in sepsis - Intensive Care Med 1996, 22 S474-81.

19. La Rosa SP, Opal SM. Biomarkers The future – Critical Care Clin 27, 2011 407-19.
20. Monneret G, Elmenkouri N, Bohe J, Debard AL, Gutowski MC, Biennu J, et al. Analytical requirements for measuring monocytic human lymphocyte antigen DR by flow cytometry: application to the monitoring of patients with septic shock. Clin Chem. 2002 Sep;48(9):1589-92.
21. Döcke WD, Höflich C, Davis KA, Röttgers K, Meisel C, Kiefer P, et al. Monitoring Temporary Immunodepression by Flow Cytometric Measurement of Monocytic HLA-DR Expression: A Multicenter Standardized Study - Clinical Chemistry 2005, 51:12 2341-2347.
22. Perry SE, Mostafa SM, Wenstone R, Shenkin A, McLaughlin PJ . Is low monocyte HLA-DR expression helpful to predict outcome in severe sepsis? - Intensive Care Med. 2003 Aug;29(8):1245-52. Epub 2003 May 28.
23. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, et al. Granulocyte-macrophage colony- stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial - Am J Respir Crit Care Med. 2009 Oct 1;180(7):640-8. Epub 2009 Jul 9.
24. Schefold JC, Zeden JP, Pschowski R, Hammoud B, Fotopoulou C, Hasper D, et al - Treatment with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is associated with reduced indoleamine 2,3-dioxygenase activity and kynurenine pathway catabolites in patients with severe sepsis and septic shock.- J Infect Dis. 2010 Mar;42(3):164-71.
25. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, et al. Early Goal Directed Therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock - N Engl J Med, Vol. 345, No. 19.
26. Wisgrill L, Spittler A, Hartmann J, Lamm C, Preißing F, Dragosits K, et al. SEP-1: Time and temperature dependent changes of LPS induced TNF- α secretion, monocyte HLA-DR expression and IL-6 levels in different anticoagulated whole blood samples - Shock. 2015 Oct;44 Suppl 2:14.

27. Slater A, Shann F, Pearson G. Paediatric Index of Mortality (PIM) Study Group. PIM2: a revised version of the Paediatric Index of Mortality. *Intensive Care Med.* 2002;28:105-7.
28. Pollack MM, Ruttimann UE, Getson PR. The Pediatric Risk of Mortality (PRISM) score, *Crit Care Med.* 1996;24:743-52.
29. Poehlmann H, Schefold JC, Zuckermann-Becker H, Volk HD, Meisel C. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit Care.* 2009;13(4):R119. Epub 2009 Jul 15.
30. Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CG, et al. Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality - *Intensive Care Med.* 2000 Jul;26(7):883-92.
31. Oberhoffer M, Vogelsang H, Russwurm S, Hartung T, Reinhart K. Outcome prediction by traditional and new markers of inflammation in patients with sepsis.- *Clin Chem Lab Med.* 1999 Mar;37(3):363-8. Erratum in: *Clin Chem Lab Med* 1999 Jun;37(6):697.
32. Hynninen M, Pettilä V, Takkunen O, Orko R, Jansson SE, Kuusela P. Predictive value of monocyte histocompatibility leukocyte antigen-DR expression and plasma interleukin-4 and -10 levels in critically ill patients with sepsis.- *Shock.* 2003 Jul;20(1):1-4.
33. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohé J, Venet F, Debard AL, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med.* 2006 Aug;32(8):1175-83. Epub 2006 Jun 2.
34. Hall MW, Knatz NL, Vetterly C, Tomarello S, Wewers MD, Volk HD, et al. Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med.* 37, 525–532 (2011).
35. Genel F, Atlihan F, Ozsu E, Ozbek E. Monocyte HLA-DR expression as predictor of poor outcome in neonates with late onset neonatal sepsis. – *J Infect* 2010 Mar;60(3):224-8. Epub 2009 Dec 16.

36. Ploder M, Pelinka L, Schmuckenschlager C, Wessner B, Ankersmit HJ, Fuerst W, et al. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production and not monocyte human leukocyte antigen-DR expression. Is correlated with survival in septic trauma patients. *Shock*. 2006 Feb;25(2):129-34.
37. Kocher AA, Dockal M, Weigel G, Griessmacher A, Grimm M, Ehrlich M, et al - Immune Monitoring in Cardiac Transplant Recipients – Transplantation Proceedings, 29, 2895-2898, 1997.
38. Payen D, Faivre V, Lukaszewicz AC, Villa F, Goldberg P – Expression of monocyte human leukocyte antigen-DR in relation with sepsis severity and plasma mediators. *Minerva Anesthesiol*. 2009 Sep;75(9):484-93.
39. Tschaikowsky K, Hedwig-Geissing M, Schiele A, Bremer F, Schywalsky M, Schüttler J. Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and postoperative patients. *Crit Care Med*. 2002 May;30(5):1015-23.
40. Lukaszewicz AC, Grienay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre V, Boval B, et al. Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit Care Med*. 2009 Oct;37(10):2746-52.
41. Kirsch M, Boval B, Damy T, Ghendouz S, Vermes E, Loisan D, et al. Importance of monocyte deactivation in determining early outcome after ventricular assist device implantation. *Int J Artif Organs*. 2012 Mar;35(3):169-76. doi: 10.5301/ijao.5000053.
42. Asadullah K, Woiciechowsky C, Döcke WD, Egerer K, Kox WJ, Vogel S, et al. Very Low monocytic HLA-DR expression. Indicates high risk of infection – Immunomonitoring for patients after neurosurgery and patients during high dose steroid therapy. – *European Journal of Emergency Medicine*, December 1995, vol 2, pp 179-245.
43. Allen ML, Peters MJ, Goldman A, Elliott M, James I, Callard R, et al. Early postoperative monocyte deactivation predicts systemic inflammation and

prolonged stay in pediatric cardiac intensive care. Crit Care Med. 2002 May;30(5):1140-5.

44. Hoffman JA, Weinberg KI, Azen CG, Horn MV, Dukes L, Starnes VA, et al. Human leukocyte antigen-DR expression on peripheral blood monocytes and the risk of pneumonia in pediatric lung transplant recipients. Transpl Infect Dis. 2004 Dec;6(4):147-55.

Anexos

Capa do artigo publicado no “*Journal of Critical Care*”.

Prolonged suppression of monocytic human leukocyte antigen-DR expression correlates with mortality in pediatric septic patients in a pediatric tertiary Intensive Care Unit☆☆☆

Talita Freitas Manzoli, MD*, Eduardo Juan Troster, PhD, Juliana Ferreira Ferranti, MD, Maria Mirtes Sales, PhD

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Immunoparalysis
HLA-DR
sepsis
septic shock
monocytic HLA-DR
pediatric intensive care

ABSTRACT

Introduction: Immunoparalysis is a syndrome with no clinical symptoms that occurs in some septic patients. Monocytic human leukocyte antigen-DR (mHLA-DR) expression has been used to identify patients in immunoparalysis and prolonged periods of reduced mHLA-DR expression have been correlated with a poor prognosis in sepsis. However, there is a lack of studies investigating mHLA-DR expression in pediatric septic patients. **Aim:** To determine if mHLA-DR expression correlates with mortality in pediatric septic patients using the QuantiBRITE Anti HLA-DR/ Anti-Monocyte Becton Dickinson novel reagent that standardizes flow cytometry values.

Methods: We determined mHLA-DR expression in 30 patients with severe sepsis or septic shock admitted to the pediatric intensive care unit at Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, between January 2013 and February 2015. mHLA-DR expression was quantified between days 3 to 5 and 5 to 7 after the onset of sepsis and the Δ mHLA-DR (mHLA-DR2 – mHLA-DR1) was calculated. We also measured mHLA-DR levels in 21 healthy control patients.

Results: Mean mHLA-DR expression was significantly lower in septic patients than in controls ($P = .0001$). Mortality was 46% in patients with negative Δ mHLA-DR or < 1000 mAb/cell and 7% in patients with positive Δ mHLA-DR or > 1000 mAb/cell. Mean Δ mHLA-DR levels were significantly different between survivors and non-survivors ($P = .0021$).

Conclusion: mHLA-DR correlates with mortality in pediatric patients with septic shock or severe sepsis. This is the first study to have used the QuantiBRITE Anti HLA-DR/ Anti-Monocyte reagent to quantify monocytic HLA-DR expression in pediatric septic patients.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The release of pro-inflammatory mediators in severe cases of sepsis leads to an inflammatory state that is termed systemic inflammatory response syndrome [1–3], which is followed by a compensatory and inflammatory response. Thus, proper immunologic balance between pro- and anti-inflammatory responses is necessary in recovery from sepsis.

Multiple therapies aimed at reducing inflammation and sepsis-related mortality were developed in the 1980s and 1990s, but the studies failed to demonstrate a survival benefit [4–6]. Also in the 1990s, other studies suggested that late mortality from surgery, sepsis, or trauma in the ICU may be associated with an acquired immune deficiency state, which was later termed immunoparalysis [7, 8]. Thus, immunoparalysis is characterized by a persistent and markedly compensatory anti-inflammatory response leading to impaired innate immune function [8].

Prolonged periods of reduced monocytic human leukocyte antigen-DR (mHLA-DR) expression correlates with poor prognosis in sepsis. In fact, an HLA-DR expression level of $< 30\%$ was associated with a 12% survival rate in adult surgical patients, whereas a survival rate of 88% was observed in patients with mHLA-DR expression $> 30\%$ [9, 10].

Despite the significant reduction in mortality from sepsis with the use of early goal-directed therapy [11, 12] and the development of new cardiopulmonary support technologies, the incidence of sepsis in intensive care units has increased in the last decade and mortality rates from severe sepsis are still high [13, 14].

* Funding: FAPESP process number 2012/02714.

** Statement of Authorship: We declare that the above article is original, was authored by the above-cited researchers, and has not been submitted for publication to any other journal.

• Conflict of Interest Statement and Funding sources: The funding for the current research project was provided by a government entity of research support (FAPESP), and there is no conflict of interest.

• Corresponding author at: Av. Prof. Francisco Manoel de Godoy 501, São Paulo-SP, CEP 05520-300, Tel.: +55 11 98108 4796.

E-mail address: talita@hsp.usp.br (T.F. Manzoli).

Exemplos de imagens de citometria de fluxo

- BEADS

Histogram Statistics

File: BEADS 02/05/13.001 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: BEADS 02/05/13 Acquisition Date: 02-May-13
 Gate: Singlets Gated Events: 9751
 Total Events: 10000 X Parameter: FL2-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	Geo Mean	CV	Median
All	1, 9910	9751	100.00	274.95	94.04	469.76
Low	6, 14	1017	10.43	9.53	15.89	9.65
Med - Low	73, 173	2715	27.84	111.33	13.97	112.40
Med - High	334, 698	2858	29.31	493.51	11.46	500.29
High	939, 1981	2742	28.12	1384.36	11.90	1407.46

Histogram Statistics

File: BEADS 21/10/13.003 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: BEADS 21/10/13 Acquisition Date: 21-Oct-13
 Gate: Singlets Gated Events: 9101
 Total Events: 10000 X Parameter: FL2-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	Geo Mean	CV	Median
All	1, 9910	9101	100.00	238.59	94.16	385.42
Low	5, 12	790	8.68	8.21	15.02	8.24
Med - Low	61, 136	2730	30.00	90.47	13.31	91.40
Med - High	262, 552	2642	29.03	399.55	11.26	406.79
High	764, 1655	2610	28.68	1146.57	12.26	1165.22

- **Controles:**

Region Statistics

File: 04/06/13 JOAO VITOR C9.001 Log Data Units: Linear
 Sample ID: 04/06/13 JOAO VITOR C9 Acquisition Date: 04-Jul
 Gate: No Gate Gated Events: 110258
 Total Events: 110258 X Parameter: CD14 Pe
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	Px,Py
R1	2752	268.51	327.64	322.06	5, 2

Histogram Statistics

File: 04/06/13 JOAO VITOR C9.001 Log Data Units: Linear
 Sample ID: 04/06/13 JOAO VITOR C9 Acquisition Date: 04-Jul
 Gate: g1 Gated Events: 2752
 Total Events: 110258 X Parameter: Anti-HLA

Marker	Left, Right	Events	Geo Mean	CV	Median
All	1, 9910	2752	1034.17	100.12	922.24

Region Statistics

File: 10/07/13 JULIA C13.001 Log Data Units: Linear Value
 Sample ID: 10/07/13 JULIA C13 Acquisition Date: 10-Jul-13
 Gate: No Gate Gated Events: 91739
 Total Events: 91739 X Parameter: CD14 PerCF
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	Px,Py
R1	4112	225.12	311.64	303.12	5, 2
R2	3542	81.43	114.48	92.78	4, 5

Histogram Statistics

File: 10/07/13 JULIA C13.001 Log Data Units: Linear Value
 Sample ID: 10/07/13 JULIA C13 Acquisition Date: 10-Jul-13
 Gate: g1 Gated Events: 4112
 Total Events: 91739 X Parameter: Anti-HLA-DR P

Marker	Left, Right	Events	Geo Mean	CV	Median
All	1, 9910	4112	517.68	138.76	433.23

- Pacientes sépticos que foram a óbito

Region Statistics

File: 12/08/13 ANNA LARA N39.001 Log Data Units: Linear
 Sample ID: 12/08/13 ANNA LARA N39 Acquisition Date: 12-Aug-2013
 Gate: No Gate Gated Events: 633163
 Total Events: 633163 X Parameter: CD14 PerCP-Cy5.5
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	Px,Py
R1	4261	188.06	327.72	313.03	5, 2
R2	12759	228.05	93.28	25.34	4, 5

Histogram Statistics

File: 12/08/13 ANNA LARA N39.001 Log Data Units: Linear
 Sample ID: 12/08/13 ANNA LARA N39 Acquisition Date: 12-Aug-2013
 Gate: g1 Gated Events: 4261
 Total Events: 633163 X Parameter: Anti-HLA-DR PE

Marker	Left, Right	Events	Geo Mean	CV	Median
All	1, 9910	4261	244.35	203.06	181.06

Region Statistics

File: 20/05/13 FATIMA S N18.001 Log Data Units: Linear
 Sample ID: 20/05/13 FATIMA S N18 Acquisition Date: 20-May-2013
 Gate: No Gate Gated Events: 199682
 Total Events: 199682 X Parameter: CD14 PerCP-Cy5.5
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	Px,Py
R1	2936	200.71	335.85	326.18	5, 2
R2	3623	68.15	149.99	128.63	4, 5

Histogram Statistics

File: 20/05/13 FATIMA S N18.001 Log Data Units: Linear
 Sample ID: 20/05/13 FATIMA S N18 Acquisition Date: 20-May-2013
 Gate: g1 Gated Events: 2936
 Total Events: 199682 X Parameter: Anti-HLA-DR PE

Marker	Left, Right	Events	Geo Mean	CV	Median
All	1, 9910	2936	593.80	112.59	582.94

- Pacientes sépticos que sobreviveram

Region Statistics

File: 19/09/13 BRAYAN N44.001 Log Data Units: Linear Val
 Sample ID: 19/09/13 BRAYAN N44 Acquisition Date: 19-Sep-
 Gate: No Gate Gated Events: 590479
 Total Events: 590479 X Parameter: CD14 PerCf
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	Px,Py
R2	16251	127.86	136.90	118.76	4, 5
R1	3586	256.88	390.71	378.64	5, 2

Histogram Statistics

File: 19/09/13 BRAYAN N44.001 Log Data Units: Linear Val
 Sample ID: 19/09/13 BRAYAN N44 Acquisition Date: 19-Sep-
 Gate: g1 Gated Events: 3586
 Total Events: 590479 X Parameter: Anti-HLA-DF

Marker	Left, Right	Events	Geo Mean	CV	Median
All	1, 9910	3586	1023.56	104.88	1113.97

Region Statistics

File: 23/04/13 FERNANDA N12.001 Log Data Units: Linear
 Sample ID: 23/04/13 FERNANDA N12 Acquisition Date: 23-Apr-
 Gate: No Gate Gated Events: 279428
 Total Events: 279428 X Parameter: CD14 Pe
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	Px,Py
R1	3840	307.37	354.73	344.73	5, 2
R2	2358	115.97	146.97	130.87	4, 5

Histogram Statistics

File: 23/04/13 FERNANDA N12.001 Log Data Units: Linear
 Sample ID: 23/04/13 FERNANDA N12 Acquisition Date: 23-Apr-
 Gate: g1 Gated Events: 3840
 Total Events: 279428 X Parameter: Anti-HLA

Marker	Left, Right	Events	Geo Mean	CV	Median
All	1, 9910	3840	374.45	158.68	305.05

Aprovação CAPPesq

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DIRETORIA CLÍNICA
COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA - CAPPesq
CADASTRO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Registro (uso reservado à Secretaria da CAPPesq)

Nº do Protocolo: Tipo: Humanos
Instituto: ICR
Registro on-line nº: 8389   Data de Entrada: 19/12/2011

Este projeto envolve:

Pacientes HC .....Sim
Médicos ou Funcionários HC (como sujeitos de pesquisa) .....Não
Documentos HC(Prontuários e Outros) .....Sim
Materiais estocados no HC .....Não
Peças anatômicas de cadáveres .....Não

1. Título do Protocolo de Pesquisa

Dosagem de HLA-DR de monócitos para avaliação de imunoparalisia na UTI
Pediátrica do ICR

2. Palavras-chaves que caracterizam o assunto da Pesquisa

Imunoparalisia, sepse grave, choque séptico,HLA-DR

3. Resumo do Protocolo de Pesquisa:

Introdução: O HLA-DR (human leukocyte antigen) é um receptor de monócitos e macrófagos do complexo de histocompatibilidade tipo II (MHC II), e a expressão do HLA-DR mede a capacidade dos monócitos de produzir citocinas pró-inflamatórias mediante estímulos nocivos. A imunoparalisia evidenciada pela expressão do HLA-DR em pacientes sépticos tem se correlacionado em diversos estudos com pior prognóstico. Em nosso trabalho será realizada a dosagem, por imunofluorescência, do HLA-DR na UTI pediátrica do ICr a fim de se definir o perfil de expressão do hla-dr de nossa população, a associação de imunoparalisia com mortalidade, e desfechos secundários. Também analisaremos, de forma apenas observacional, o efeito de diferentes medidas terapêuticas na dosagem do HLA-DR. **Objetivos:**

1. Estabelecer o perfil de expressão do hla-dr de pacientes com sepse grave ou choque séptico internados na UTI pediátrica do ICr, 2. avaliar a incidência de imunoparalisia, 3. avaliar fatores de risco associados ao desenvolvimento de imunoparalisia, 4. avaliar se a imunoparalisia é um fator prognóstico para mortalidade e morbidade (disfunção de múltiplos órgãos, dias livres de ventilação mecânica, dias livre de drogas vasoativas). **Metodologia:** Será realizado um estudo de Coorte prospectivo para definir o perfil imune dos pacientes com sepse grave ou choque séptico que estiverem internados na UTI pediátrica do ICr no período do estudo através da dosagem da expressão do HLA-DR nestes pacientes. Também será dosado o HLA-DR de 20 pacientes controle que não tenham o diagnóstico de imunodeficiência, que não apresentem sinais de infecção, e que necessitem de coleta de exames de rotina para cirurgia eletiva ou controle ambulatorial. Serão

excluídos do estudo pacientes com choque séptico que vierem a óbito em menos de 48h após a admissão na UTI ou que já houverem participado do estudo durante sua internação. Serão também coletados dados do prontuário dos pacientes que estiverem incluídos no estudo (diagnóstico, uso ou não de imunossupressor, corticóide, filgrastima, metoclopramida, imunoglobulina, dopamina, claritromicina, contagem de neutrófilos e linfócitos na época da coleta do HLA-DR, dias livres de ventilação mecânica e de drogas vasoativas, desfecho clínico). Os pacientes serão acompanhados até o desfecho clínico (óbito ou alta da UTI). Para dosagem do HLA-DR serão coletados 1ml de sangue dos pacientes por punção venosa periférica ou através de cateter venoso ou arterial. A amostra será armazenado em tubo de EDTA que deverá ser estocado em isopor com gelo e transportado para o laboratório de citometria de fluxo o mais rapidamente possível. O sangue deverá ser coletado entre o 3º e o 5º dia após o diagnóstico de sepse grave ou choque séptico. A coleta deverá ser realizada juntamente com a coleta dos exames de rotina do paciente não sendo necessário punção adicional para realização do exame de citometria de fluxo para dosagem de HLA-DR.

4. Pesquisador Responsável:

Eduardo Juan Troster

<http://lattes.cnpq.br/6261000726520531>

Graduação: Medicina

Vínculo: HC, FFM

5. Pesquisador Executante:

Talita Freitas Manzoli

<http://lattes.cnpq.br/0022660679045669>

6. Possui co-autores?

Sim

Nome dos co-autores: Giuliana Romano, Thaisa Castilho

7. Onde a Pesquisa será realizada?

Departamento: Pediatria

Disciplina: Pediatria Neonatal

LIM: LIM/40 - Lab Imuno-Hematologia e Hematologia Forense

8. Existe entidade externa envolvida?

Não

9. Possui participação Estrangeira

Não

10. O projeto é multicêntrico

Não

11. Outros serviços/ divisões do HCFMUSP envolvidos na pesquisa

Sim

Laboratório de hematologia, setor citometria de fluxo, HCFMUSP

12. Finalidade acadêmica da pesquisa e classificação

Mestrado

13. Investigação

Prospectiva

14. Materiais e métodos

Laboratorial

Prontuários de pacientes

Tecidos, órgãos, fluídos orgânicos

15. Gênero, classificação da Pesquisa

Clínica

16. Áreas temáticas previstas na Res. 196/96

Novos Fármacos, Vacinas e testes diagnósticos

17. Patrocínio

FAPESP

18. Valor do financiamento

21.000,00

19. Cronograma de execução da pesquisa

Prazo: 48 meses

20. Assinaturas

Dr. Eduardo Juan Trosier
Pediatra
CRM 27496

Eduardo Trosier

Assinatura e carimbo do Pesquisador

Aprovado em 23 / 02 / 2012

Assinatura e carimbo da Chefia
com data de aprovação
pelo Conselho do Departamento

APROVADO PELO CONSELHO DO
DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA FMUSP
EM 03 / 02 / 2012

Vicente Odone Filho
Prof. Vicente Odone Filho
Chefe

Aprovado em ____ / ____ / ____

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Controles

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : ☐ M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....
2. RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: ☐ M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
.....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
.....
CEP: ..... TELEFONE: ..... DDD
(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : “Dosagem de HLA-DR de monócitos para avaliação de imunoparalisia na UTI Pediátrica do ICR”

2. PESQUISADOR : **Dra. Talita Freitas Manzoli** CARGO/FUNÇÃO: **Médica**
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **131454**
UNIDADE DO HCFMUSP: **Unidade de Terapia Intensiva do Instituto da Criança**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ X RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

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

O paciente acima identificado que faz acompanhamento no ambulatório de especialidades do Instituto da Criança está sendo convidado a participar como controle do estudo “Dosagem de HLA-DR de monócitos para avaliação de imunoparalisia na UTI Pediátrica do ICR” , sob responsabilidade da Dra. Talita Freitas Manzoli. Gostaríamos de solicitar a sua colaboração e de seus responsáveis legais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Infeções graves, chamadas de sepse, são freqüentes causas de internação em UTIP e tem altas taxas de mortalidade (cerca de 50% dos casos), sendo considerada um grande problema de saúde.

O sistema imune é o responsável em nosso organismo por combater infecções, e alguns estudos recentes mostram que a presença de uma resposta imune prejudicada (medida através de um exame chamado dosagem de HLA-DR) em pacientes com sepse pode representar um aumento de mortalidade de 12% no grupo que não tem alteração do HLA-DR, para 88% no grupo que tem uma diminuição do HLA-DR.

Em nosso estudo iremos realizar a dosagem do HLA-DR nos pacientes internados em UTIP com infecção grave e também em pacientes em acompanhamento ambulatorial, sem infecção no momento da coleta, e sem qualquer imunodeficiência, como é o caso do paciente acima identificado. Também utilizaremos dados do prontuário do paciente.

A coleta do HLA-DR de pacientes em acompanhamento ambulatorial será feita no mesmo momento da coleta de exames de rotina solicitados a critério do médico que acompanha o paciente, não sendo necessário punção adicional. Será utilizado 1ml de sangue para a dosagem de HLA-DR

Essas informações estão sendo fornecidas para a participação voluntária neste estudo, que visa estabelecer se realmente baixas dosagens de HLA-DR se correlacionam com o diagnóstico de sepse grave e com um aumento da mortalidade em pacientes sépticos. Não há benefício direto para os participantes. Porém os dados finais da pesquisa serão importantes para os médicos que atuam em UTI pediátrica que poderão usar terapêuticas para reverter esta resposta imune prejudicada e com isso melhorar o tratamento das crianças com infecção grave e assim, possivelmente, diminuir a mortalidade por sepse.

A realização da pesquisa não modificará em nada o tratamento do paciente. A qualquer momento os senhores terão acesso as informações sobre a pesquisa e sobre os dados relativos ao paciente. A equipe médica estará disponível a qualquer momento para esclarecimento de qualquer dúvida relacionada ao tratamento e à pesquisa. O paciente ou seus responsáveis poderão retirar seu consentimento para a pesquisa em qualquer momento se assim o desejarem, sem que isso traga qualquer prejuízo ao tratamento.

O principal investigador é a Dra. Talita Freitas Manzoli, que pode ser encontrada no endereço: Av. Dr. Enéas de Carvalho, 261 (Instituto da Criança – Hospital das Clínicas – USP- UTI pediátrica), São Paulo, Brasil. O telefone da UTIP é : 55-11-2661- 8599

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo “Octávio Frias de Oliveira” - 21º andar – sala 36 - Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP - CEP: 01246-000

.- É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
- Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
- Despesas e compensações: 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.
- Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

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 “Dosagem de HLA-DR de monócitos para avaliação de imunoparalisia na UTI Pediátrica do ICR”

Eu discuti com a Dra. Talita Freitas Manzoli 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 ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Pacientes sépticos

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....
2. RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
.....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
.....
CEP: ..... TELEFONE: ..... DDD
(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : “Dosagem de HLA-DR de monócitos para avaliação de imunoparalisia na UTI Pediátrica do ICR”

2. PESQUISADOR : **Dra. Talita Freitas Manzoli** CARGO/FUNÇÃO: **Médica**
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **131454**
UNIDADE DO HCFMUSP: **Unidade de Terapia Intensiva do Instituto da Criança**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

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

O paciente acima identificado que está internado nesta unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP), está sendo convidado a participar do estudo “Dosagem de HLA-DR de monócitos para avaliação de imunoparalisia na UTI Pediátrica do ICR” , sob responsabilidade da Dra. Talita Freitas Manzoli. Gostaríamos de solicitar a sua colaboração e de seus responsáveis legais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Em casos como o do paciente acima, as infecções graves, chamadas de sepse, são freqüentes causas de internação em UTIP e tem altas taxas de mortalidade (cerca de 50% dos casos), sendo considerada um grande problema de saúde.

O sistema imune é o responsável em nosso organismo por combater infecções, e alguns estudos recentes mostram que a presença de uma resposta imune prejudicada (medida através de um exame chamado dosagem de HLA-DR) em pacientes com sepse pode representar um aumento de mortalidade de 12% no grupo que não tem alteração do HLA-DR, para 88% no grupo que tem uma diminuição do HLA-DR.

Em nosso estudo iremos realizar a dosagem do HLA-DR nos pacientes com infecção grave entre o 3º e o 5º dia após o diagnóstico da sepse e 2 a 4 dias após esta dosagem inicial. Para a realização desta dosagem serão coletados 1ml de sangue dos pacientes por punção venosa periférica ou através de cateter venoso ou arterial, juntamente com a coleta dos exames de rotina do paciente não sendo necessário punção adicional para realização do exame. Também utilizaremos dados do prontuário do paciente.

Essas informações estão sendo fornecidas para a participação voluntária neste estudo, que visa estabelecer se realmente baixas dosagens de HLA-DR se correlacionam com um aumento da mortalidade. Não há benefício direto para os participantes. Porém os dados finais da pesquisa serão importantes para os médicos que atuam em UTI pediátrica que poderão usar terapêuticas para reverter esta resposta imune prejudicada e com isso melhorar o tratamento das crianças com infecção grave e assim, possivelmente, diminuir a mortalidade por sepse.

A realização da pesquisa não modificará em nada o tratamento do paciente. A qualquer momento os senhores terão acesso as informações sobre a pesquisa e

sobre os dados relativos ao paciente. A equipe médica estará disponível a qualquer momento para esclarecimento de qualquer dúvida relacionada ao tratamento e à pesquisa. O paciente ou seus responsáveis poderão retirar seu consentimento para a pesquisa em qualquer momento se assim o desejarem, sem que isso traga qualquer prejuízo ao tratamento.

O principal investigador é a Dra. Talita Freitas Manzoli, que pode ser encontrada no endereço: Av. Dr. Enéas de Carvalho, 261 (Instituto da Criança – Hospital das Clínicas – USP- UTI pediátrica), São Paulo, Brasil. O telefone da UTIP é : 55-11-2661- 8599

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo “Octávio Frias de Oliveira” - 21º andar – sala 36 - Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP - CEP: 01246-000

.- É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
- Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
- Despesas e compensações: 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.
- Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

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 “Dosagem de HLA-DR de monócitos para avaliação de imunoparalisia na UTI Pediátrica do ICR”

Eu discuti com a Dra. Talita Freitas Manzoli 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 ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____