MICHELLE CAROLINA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS PRODUTORES DE IFN-γ E IL-17 EM PACIENTES SÉPTICOS E RELAÇÃO COM O DESFECHO CLÍNICO

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

MICHELLE CAROLINA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS PRODUTORES DE IFN-γ E IL-17 EM PACIENTES SÉPTICOS E RELAÇÃO COM O DESFECHO CLÍNICO

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo programa de pós-graduação em Infectologia.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Salomão

Co-Orientadora: Dra. Milena Karina Coló Brunialti

São Paulo

2010

Santos, Michelle Carolina

Avaliação das populações de linfócitos produtores de IFN-γ e IL-17 em pacientes sépticos e relação com o desfecho clínico.

/Michelle Carolina dos Santos. São Paulo, 2010.

xvi, 79f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Infectologia.

Título em inglês: Evaluation of lymphocyte populations producing IFN-γ and IL-17 in septic patients and relation to clinical outcome.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA

Chefe do Departamento: Prof. Angelo Amato Vincenzo de Paola

Chefe da Disciplina: Prof. Dr. Eduardo Alexandrino Sérvolo de Medeiros

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

MICHELLE CAROLINA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS PRODUTORES DE IFN-γ E IL-17 EM PACIENTES SÉPTICOS E RELAÇÃO COM O DESFECHO CLÍNICO

Presidente da Banca:

Prof. Dr. Reinaldo Salomão

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza

Prof. Dr. Esper Georges Kallás

Prof. Dr. Otelo Rigato Junior

SUPLENTE

Prof. Dr. Álvaro Pacheco

Dedicatória

Aos meus pais, que sempre acreditaram e me apoiaram em todos os momentos da minha vida e são o meu porto seguro. Amo vocês!

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Reinaldo Salomão, pela oportunidade de ingressar no mestrado e acreditar no meu trabalho. Pelo incentivo para as novas descobertas profissionais, sempre com muito carinho.

À Dra. Milena Karina Coló Brunialti, pela paciência em me conduzir e me ensinar a "andar" sozinha, com muita ética e responsabilidade, sempre mostrando o melhor caminho. Por ser minha co-orientadora e amiga.

Aos meus amigos do laboratório de Imunologia: Amanda, Antonia, Giovana, Leandro, Maria, Marialice, Marjorie, Sidnéia e Selma. Pelo carinho, amizade e por toda a ajuda que me deram.

Aos meus amigos do laboratório de Virologia. Pela amizade, conversas e cafés repleto de guloseimas e muitas risadas é claro.

A toda minha família pelo carinho sem limites.

Ao meu tio, sempre com ótimo humor, me fazendo rir com suas palhaçadas e que Deus o quis perto Dele e infelizmente não está mais entre nós. Sinto muito sua falta...

Aos médicos que colaboraram para este estudo com a inclusão de pacientes.

Aos voluntários que aceitaram participar deste estudo.

À Deus por me iluminar e guiar em todos os momentos da minha vida.

"É muito melhor arriscar coisas grandiosas,
alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota,
do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito,
porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota."

Theodore Roosevelt

"Amo a liberdade, por isso deixo as coisas que amo livres.
Se elas voltarem é porque as conquistei.
Se não voltarem é porque nunca às possuí."

John Lennon

Sumário

DEDICATÓRIA..... vi
AGRADECIMENTOS..... vii
LISTAS..... xii
RESUMO..... xviii
1.0 INTRODUÇÃO..... 1
1.1 Definição de Sepse..... 2
1.2 Epidemiologia..... 4
1.3 Fisiopatologia..... 6
1.4 Linfócitos T (Th1, Th2, Th17, Treg)……..... 7
1.5 Dinâmica da resposta inflamatória na sepse..... 11
2.0 HIPÓTESE OU JUSTIFICATIVA..... 15
3.0 OBJETIVOS..... 17
4.0 CASUÍSTICA E MÉTODOS..... 19
4.1. Casuística..... 20
4.1.1 Aspectos éticos e tamanho da amostra..... 20
4.1.2 Critérios de inclusão..... 20
4.1.3 Critérios de exclusão..... 21
4.2 Reagentes e estímulos utilizados..... 22
4.3 Amostras de Sangue..... 23
4.4 Métodos..... 23
4.4.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)..... 23
4.4.2 Congelamento das amostras..... 24
4.4.3 Descongelamento das amostras..... 24
4.4.4 Estimulação in vitro de células mononucleares do sangue periférico..... 25
4.4.5 Marcação para detecção intracelular de citocinas em linfócitos..... 25
4.4.6 Aquisição e análise de dados para detecção de citocina intracelular..... 27
4.5 Citometria de fluxo..... 30
4.6 Análise Estatística..... 30

5.0 RESULTADOS..... 31
5.1 Informações clínicas e epidemiológicas dos pacientes sépticos e indivíduos sadios..... 32
5.2 Produção intracelular de IFN-γ e IL-17 em linfócitos TCD4+..... 33
5.3 Avaliação da produção intracelular de IFN-γ e IL-17 nos diferentes estadios da sepse (sepse grave e choque séptico) 35
5.4 Avaliação da produção intracelular de IFN-γ e IL-17 no seguimento da sepse (D0 e D7)..... 37
5.5 Avaliação da produção intracelular de IFN-γ e IL-17 por linfócitos TCD4+ nas amostras D0 e D7 em relação ao desfecho clínico hospitalar... 39
5.6 Avaliação da produção intracelular de IFN-γ e IL-17 comparando-se sobrevida e óbito no seguimento da sepse (D0 e D7)..... 43
6.0 DISCUSSÃO..... 46
7.0 CONCLUSÃO..... 53
8.0 ANEXOS..... 56
9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 71
10.0 ABSTRACT..... 78

Lista de Figuras

Figura 1. Definições de SIRS, Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico..... 4

Figura 2. Diferenciação das células T helper..... 11

Figura 3. Estratégia de aquisição de linfócitos em CMSP..... 28

Figura 4. Estratégia de análise da população de linfócitos TCD4 em CMSP..... 29

Figura 5. Detecção e análise da produção intracelular de IFN-γ e IL-17 em linfócitos TCD4..... 29

Figura 6. Porcentagem de linfócitos TCD4+ produtores de IFN-γ e IL-17 em CMSP de indivíduos sadios e pacientes sépticos. 34

Figura 7. Porcentagem de linfócitos TCD4+ produtores de IFN-γ e IL-17 em CMSP de pacientes sépticos nos diferentes estadios (sepse grave e choque séptico)..... 36

Figura 8. Porcentagem de linfócitos TCD4+ produtores de IFN-γ e IL-17 em CMSP de pacientes sépticos nos dias 0 (D0) e 7 (D7) de coleta..... 38

Figura 9. Porcentagem de linfócitos TCD4+ produtores de IFN-γ e IL-17 em CMSP de pacientes sépticos que sobreviveram e entraram em óbito..... 41

Figura 10. Porcentagem de linfócitos TCD4+ produtores de IFN-γ e IL-17 em CMSP de pacientes sépticos que sobreviveram e entraram em óbito..... 42

Figura 11. Porcentagem de linfócitos TCD4+ produtores de IFN-γ no dia zero e sete de pacientes sobreviventes e não sobreviventes..... 44

Figura 12. Porcentagem de linfócitos TCD4+ produtores de IL-17 no dia zero e sete de pacientes sobreviventes e não sobreviventes..... 45

Lista de Quadros

Quadro 1 Alguns sinais de sepse..... 3

Lista de Tabelas

Tabela 1. Média de idade dos indivíduos sadios e pacientes sépticos 21

Tabela 2. Porcentagem do gênero dos indivíduos sadios e pacientes sépticos..... 21

Tabela 3. Anticorpos de superfície e quantidades utilizadas..... 26

Tabela 4. Anticorpos intracelulares e quantidades utilizadas..... 27

Tabela 5. Porcentagem de linfócitos TCD4+ produtores de IFN-γ ou IL-17..... 33

Tabela 6. Produção de IFN-γ e IL-17 na população de linfócitos TCD4+ em pacientes sépticos nos diferentes estadios da sepse..... 35

Tabela 7. Porcentagem de linfócitos TCD4+ produtores de IFN-γ e IL-17 em pacientes sépticos nos dias 0 (D0) e dia 7 (D7)... 37

Tabela 8. Porcentagem de linfócitos TCD4+ produtores de IFN-γ e IL-17 de pacientes sépticos no dia 0 de coleta (D0) em relação ao desfecho clínico..... 40

Tabela 9. Porcentagem de linfócitos TCD4+ produtores de IFN-γ e IL-17 de pacientes sépticos no dia 7 de coleta (D7) em relação ao desfecho clínico..... 40

Tabela 10. Gênero e idade dos voluntários sadios..... 57

Tabela 11. Informações clínicas e epidemiológicas dos pacientes sépticos..... 59

Lista de Abreviaturas

ACCP	American College of Chest Physicians
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
APC	Células apresentadoras de antígeno
APC	aloficocianina
BD	Becton Dickinson
bpm	Batimentos por minuto
CD	“cluster of differentiation”
CIA	Artrite induzida por colágeno
CLP	Ligadura e punção do ceco
CMSP	Separação de células mononucleares do sangue periférico
CO_2	dióxido de carbono
˚C	graus Celsius
D	Dia
DA	Dermatite atópica
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAE	Encefalomielite autoimune experimental
EAU	Uveíte autoimune experimental
FC	Frequência cardíaca
FCS	Soro fetal bovino
FITC	fluoresceína isotiocianato
Foxp3	Forkhead Box P3
FR	Frequência respiratória
FSC	Dispersão frontal de luz
g	gravidade (velocidade de centrifugação)
g	grama
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
HEPES	4(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
HMGB-1	High-mobility group protein B1
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G

IL	interleucina
irpm	Incursões respiratórias por minuto
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
µg	micrograma
mg	miligrama
µL	microlitro
M	Molar
mL	mililitro
mmHg	Milímetro de mercúrio
MS	Esclerose múltipla humana
ng	nanograma
nm	nanômetro
NK	Natural killer
NO	óxido nítrico
PBS	solução tampão fosfatada
PCO_2	Pressão do gás carbônico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	ficoeritrina
PECy7	Ficoeritrina conjugada a cianina 7
PerCP	clorofila peridinina
PGE	prostaglandina
PMA	Forbol-Meristato-Acetato
PROWESS	Avaliação do recombinante da proteína C ativada na sepse grave
qRT-PCR	Real-time quantitative reverse transcription
ROR	Orphan nuclear receptor
SCCM	Society of Critical Care
SIRS	Resposta inflamatória sistêmica associada à infecção
SLEDAI	Systemic lúpus erythematosus disease activity index
SNC	Sistema nervoso central
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
SSC	Dispersão lateral de luz
STAT	Signal transducers and activators of transcription protein

SvO_2	Saturação do sangue venoso misto
TCR	Receptor de células T
TGF-β	fator transformador de crescimento-beta
Th	T helper
TNF-α	fator de necrose tumoral-alfa
Treg	T regulatórias
iTreg	Células T regulatórias induzidas
nTreg	Células T regulatórias naturais
UI	Unidades inernacionais
UTI	Unidade de terapia intensiva

Resumo

A resposta inflamatória é modulada durante a sepse e a regulação positiva ou negativa da atividade celular depende das células e funções avaliadas. IFN-γ e IL-17 são citocinas características das subpopulações de linfócitos Th1 e Th17, respectivamente, e desempenham papel importante na resposta imune, ligando a imunidade inata e adaptativa. **Objetivo:** Avaliar a presença das células Th1 e Th17 em pacientes sépticos na admissão do estudo (D0) comparado-a com sadios e após 7 dias (D7) de seguimento. **Casuística e Métodos:** Foram incluídos 59 pacientes sépticos no D0, dos quais 31 tiveram amostras colhidas no D7, e 30 indivíduos sadios. As células mononucleares do sangue periférico foram separadas e congeladas em nitrogênio líquido. Após descongelamento e ajuste da concentração para $1x10^6$ células/mL, as células foram estimuladas ou não com PMA/ionomicina e mantidas por 30 minutos em estufa a 37ºC a 5% CO_2. Foi acrescentado brefeldina A e incubadas por mais 15 horas. Em seguida, foi feita marcação de superfície para a identificação dos linfócitos TCD4 (CD3+CD8-). As células foram permeabilizadas e marcadas para detecção de IL-17A e IFN-γ intracelular. As amostras foram lidas em citômetro FACSCanto e analisadas no programa FlowJo. **Resultados:** A produção basal de IFN-γ e IL-17A foi maior nos pacientes comparado aos sadios (P=0,002 e P<0,001, respectivamente). Após estímulo, a produção de IL-17A foi maior nos pacientes (P=0,027) enquanto a de IFN-γ foi superior nos sadios (P=0,001). Ao comparar os diferentes estadios da sepse, foi observado aumento na produção de IFN-γ após estímulo com PMA/ionomicina nos pacientes em choque séptico em relação aos pacientes em sepse grave (P=0,039). A produção de IFN-γ basal e após estímulo mostrou-se aumentada no D7 em relação ao D0 (P=0,007 e P=0,018, respectivamente). Em contraste, a produção de IL-17 após estímulo foi maior no D0 comparado ao D7 (P=0,003), mas não foi encontrada diferença significativa na condição basal. Nos pacientes que evoluíram a óbito, as amostras do D0 apresentaram menor produção constitutiva de IFN-γ em relação ao D7 (P=0,023), mas após estímulo não foi encontrada diferença. Nos pacientes que sobreviveram, não houve diferença na condição basal e após estímulo com PMA/ionomicina. A produção de IL-17, após estímulo foi maior na amostra D0 em relação ao D7 (P=0,006) nos pacientes que sobreviveram, já na condição basal não houve diferença. Os pacientes que evoluíram a óbito não apresentaram diferença na condição basal e após estímulo com PMA/ionomicina. **Conclusão:** Os resultados basais com maior produção de citocinas nos sépticos refletem o grau de inflamação característico da sepse. Observamos uma dicotomia entre as respostas Th1 e Th17 após PMA/ionomicina nos pacientes sépticos, com aumento da população Th17 e diminuição da Th1 em relação aos sadios. Aumento da população Th1 no D7 foi relacionado com mortalidade, enquanto diminuição da população Th17 foi relacionada com sobrevida, indicando que a persistência ou exacerbação das respostas Th1 e Th17 podem ser deletérias. Estes achados sugerem regulação da resposta inflamatória na sepse das populações Th1 e Th17.

Introdução

1.0 – INTRODUÇÃO

1.1 – Definição de Sepse

Sepse é definida como uma resposta inflamatória sistêmica (SIRS) associada à infecção (*American College of Chest Physicians/Society of Critical Care (ACCP/SCCM)* – Bone *et al.*, 1992). O quadro clínico de sepse pode ser definido por vários critérios como: alteração de temperatura (> 38°C ou < 36°C), frequência cardíaca (>90 bpm), elevação da frequência respiratória (>20irpm ou PCO2<32mmHg), presença de leucocitose, leucopenia ou de células imaturas no sangue periférico. Os autores caracterizam as diversas fases da sepse como se segue:

→ Infecção – processo patológico causado pela invasão de um tecido normalmente estéril ou líquido ou cavidade corporal por microorganismos patogênicos ou potencialmente patogênicos.

→ Sepse – síndrome clínica de resposta inflamatória sistêmica definida pela presença de infecção.

→ Sepse grave – sepse associada à disfunção de órgãos.

→ Choque séptico – sepse grave, além de um estado agudo de falha circulatória caracterizada por hipotensão arterial persistente (definida por uma pressão arterial sistólica abaixo de 90mmHg, pressão arterial média <60mmHg ou uma redução de pressão arterial sistólica >40mmHg em basal) inexplicável por outras causas, apesar de reposição volêmica adequada.

Uma nova reunião de consenso realizada em 2001 manteve os conceitos básicos de sepse e destacou parâmetros clínicos e laboratoriais para

o diagnóstico da sepse, enfatizando a disfunção orgânica (Levy *et al.*, 2003). O quadro 1 ilustra algumas das manifestações clínicas da sepse e das disfunções orgânicas associadas (Vincent, 2008a).

Quadro 1: Alguns sinais de sepse. (adaptado de Vincent, 2008a).

Sinais e sintomas gerais
Tremores, febre (às vezes hipotermia)
Taquipnéia/ Alcalose respiratória
Balanço líquido positivo/ edema
Reação generalizada hematológica/ inflamatória
Aumento (às vezes diminuição) das células brancas do sangue
Aumento de marcadores inflamatórios (proteína C reativa, procalcitonina, IL-6)
Alterações hemodinâmicas
Hipotensão arterial
Taquicardia inexplicada
Aumento do débito cardíaco/ baixa resistência vascular sistêmica/ SvO_2 alta
Perfusão da pele alterada
Diminuição da produção de urina
Hiperlactatemia inexplicável/ déficit de base aumentado
Sinais de disfunção orgânica

A escala crescente de gravidade da resposta inflamatória e da sepse é definida por critérios propostos pelo consenso ACCP/SCCM de 1991 conforme figura 1 (Henkin *et al.*, 2009).

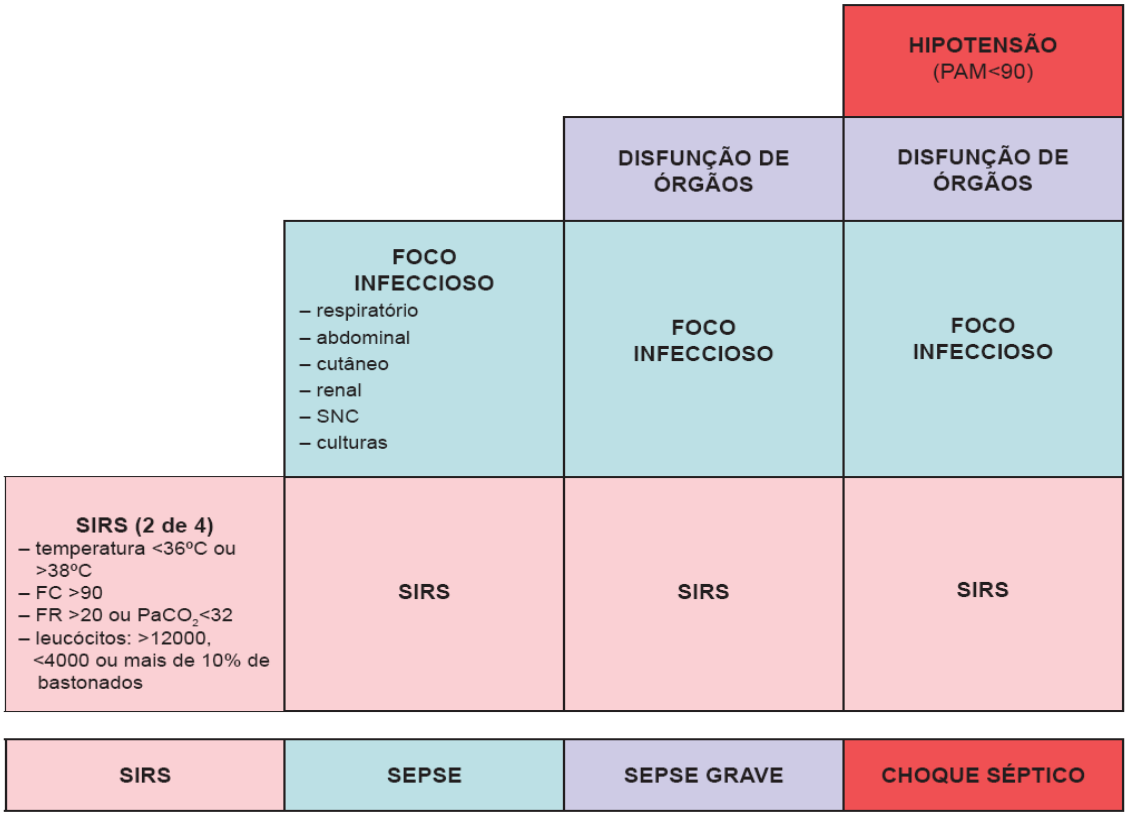

Figura 1: Definições de SIRS, Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico (Adaptado de Henkin *et al.*, 2009)

1.2 – Epidemiologia

A maioria dos estudos epidemiológicos sobre a sepse foi realizada na América do Norte, Europa e Austrália. A prevalência, ou seja, o percentual da população que é afetada pela sepse em um determinado momento e a incidência, isto é, o número de novos episódios de sepse que ocorrem durante um determinado período de tempo em uma população específica, foram as técnicas principais utilizadas para avaliar quantas pessoas são afetadas pela sepse. A incidência de sepse registrada em diversos estudos reflete apenas os casos tratados e podem subestimar a real incidência da infecção em qualquer população (Linde-Zwirble & Angus, 2004). Em estudo realizado em um único país na Europa, a incidência de sepse grave foi várias vezes indicado como

sendo entre 0,4 e 1 caso para 1000 pessoas. Em 2001 o estudo francês Episepsis relatou uma incidência de sepse grave de 0,95 para 1000 pessoas (Brun-Buisson *et al.*, 2004), enquanto que nos países baixos a incidência foi estimada em 0,54 para 1000 pessoas (van Gestel *et al.*, 2004). Em três hospitais em Madri, na Espanha, Esteban *et al.* em 2007, calcularam uma incidência estimada da sepse de 1,04 para 1000 pessoas (Esteban *et al.*, 2007). Outro estudo realizado na Alemanha relatou incidência entre 0,76 e 1,1 para 1000 pessoas (Engel *et al.*, 2007). Taxas de incidência semelhantes também foram relatadas na Austrália (Sundararajan *et al.*, 2005), no entanto nos Estados Unidos foram observadas taxas mais elevadas em 3 para 1000 pessoas (Angus *et al.*, 2001), apesar de acreditar-se que estes relatórios estejam superestimados (Wenzel & Edmond, 2001).

Existem poucos dados sobre a incidência de sepse em países emergentes. Um estudo de prevalência pontual de 254 Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) realizado no México em 1995 mostrou que 58% dos pacientes estavam infectados, sendo que 23% com pelo menos uma infecção adquirida na UTI (Ponce de Leon-Rosales *et al.*, 2000). Mais recentemente, um estudo no Brasil informou que 27% dos pacientes de UTI apresentaram quadro de sepse grave. Esses autores relataram que foram admitidos mais pacientes com sepse grave em hospitais públicos do que nos hospitais privados (35% e 15%, respectivamente). Uma das causas possíveis seria o pior estado nutricional e ao atendimento tardio dos pacientes de hospitais públicos em comparação aos hospitais privados (Silva *et al.*, 2004). Um estudo de 10 hospitais em 6 províncias da China informou que 8,7% das internações cirúrgicas em UTIs tiveram sepse grave, um número inferior a taxa de 30% encontrada em estudo

realizado em UTIs européias (estudo SOAP); novamente diferenças na definição e populações podem ser responsáveis por estas variações (Vincent, 2008b).

1.3 – Fisiopatologia

A importância da sepse pode ser inferida pela sua elevada morbidade e mortalidade (Salomão *et al.*, 1992; 1993). A compreensão da sepse é complexa porque envolve múltiplos fatores simultaneamente como virulência, tamanho do inóculo, doenças de base, estado nutricional, idade e presença de polimorfismos que interferem na resposta imune.

A partir da década de 90 surgiram trabalhos apontando as citocinas inflamatórias como um dos principais mediadores do quadro clínico da sepse. A produção de citocinas inflamatórias pode ser desencadeada inicialmente pelas endotoxinas e exotoxinas presentes na superfície de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente, e também pelo reconhecimento de outros antígenos específicos dos patógenos. Durante a fase inicial de uma infecção, a resposta inflamatória pode ajudar a contê-la, mas também exercer efeitos negativos ao hospedeiro quando exacerbada ou prolongada. Em pacientes sépticos, a patogênese que leva à falência de múltiplos órgãos, seguida de morte, ainda é assunto de intenso debate. Os mecanismos adaptativos da resposta imune e inflamatória do hospedeiro na sepse são imperativos no controle da infecção, e ao mesmo tempo, é mediadora de alterações funcionais, que são a base fisiopatológica das manifestações clínicas (Bilate & Cunha Neto, 2007).

1.4 – Linfócitos T (Th1, Th2, Th17, Treg)

Em resposta a uma infecção, uma variedade de células do sistema imune inato e adaptativo é ativada e colaboram no controle e eliminação de patógenos invasores. O desencadeamento da resposta imune adaptativa depende do reconhecimento do antígeno processado pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) aos linfócitos T CD4+ (também conhecidas como T auxiliadora -Th) (Abbas *et al.*, 2003; Zhu & Paul, 2008). As diversas funções das células T CD4 podem ser determinadas por seus padrões de secreção de citocinas e suas localizações nos tecidos (Zhu & Paul, 2010).

No início da década de 80, imunologistas chegaram a acreditar que diferentes tipos de células Th estavam envolvidos na resposta imune humoral e celular. Em 1986, Coffman e Mosmann revelaram a existência de Th1 e Th2 se diferindo entre si pelas suas citocinas produzidas (Mosmann *et al.*, 1986). Atualmente sabe-se que as células Th1 produzem principalmente IFN-γ, sendo importante para a ativação de macrófagos e liberação de patógenos intracelulares. Já as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, possuem a função de recrutamento de eosinófilos e remoção de parasitas extracelulares (Szabo *et al.*, 2003; Ansel *et al.*, 2006). O desbalanço das células Th1 e Th2 pode desencadear muitas doenças. A resposta Th1 pode causar doenças auto-imunes órgão-específicos, enquanto Th2 é responsável por asma e outras reações alérgicas (Zhu & Paul, 2010).

É sugerido que nos tecidos específicos em doenças auto-imunes, como uveíte auto-imune experimental (EAU), encefalomielite auto-imune experimental (EAE) e esclerose múltipla humana (MS), as células Th1 são pró-

inflamatórias efetoras de autoimunidade, enquanto as células Th2 antagonizam esse efeito (Saoudi *et al.*, 1993; Cua *et al.*, 1995). O papel das células Th1 na EAE foi posteriormente confirmado por relatos de que os camundongos que não possuem o fator de transcrição específico da linhagem Th1, T-bet e STAT4, estão protegidos da doença (Panitch, 1992). A diferenciação a favor da resposta de Th1 foi posteriormente demonstrada ser uma conseqüência da falta de IL-23 e não de IL-12 (Langrish *et al.*, 2005). As células Th1 também foram associadas à patologia de outros modelos de auto-imunidade, incluindo EAU (Tarrant *et al.*, 1998) e artrite induzida por colágeno (CIA) (Germann *et al.*, 1996). Alguns estudos entre a década de 90 e o início de 2000 contestaram que as células Th1 seriam mediadoras da inflamação auto-imune, apesar de muitos acreditarem nisso. O uso de anticorpos neutralizantes para IFN-γ ou deleção genética em camundongos não confere resistência a EAE, CIA e EAU (Ferber *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1997; Matthys *et al.*, 1998). Em todos os casos os camundongos desenvolveram sintomas agravados. Camundongos com deficiência na IL-12p35 exibiram um fenótipo similar aos com deficiência no IFN-γ, com sintomas da doença agravados na EAE e EAU (Luger *et al.*, 2008; Gran *et al.*, 2002). Esses resultados mostram que IFN-γ, considerada uma citocina que define a resposta de Th1 e pode realmente desempenhar um papel protetor na auto-imunidade (Damsker *et al.*, 2010).

Com a descoberta da IL-23, que compartilha a subunidade p40 com IL-12, ficou claro que muitas doenças auto-imunes, atribuído anteriormente às células Th1, são induzidas por outras células Th responsivas a IL-23 (Langrish *et al.*, 2005). Esta linhagem de células, denominada de Th17, recentemente descrita, é uma potente produtora de IL-17A e IL-17F, ambas pertencentes à

família da citocina IL-17, que inclui IL-17B, IL-17C, IL-17D e IL-17E (também conhecido como IL-25) (Kolls and Linden, 2004), IL-21 e IL-22 (Nurieva *et al.*, 2007). Além da participação em doenças auto-imunes, as células Th17 têm papel crítico na resposta imune contra bactérias extracelulares e fungos (Weaver *et al.*, 2007). As células Th17 diferenciadas expressam o receptor nuclear órfão (RORγt), e os camundongos com células T deficientes para esse fator de transcrição não conseguem desenvolver essas células (Ivanov *et al.*, 2006). A expressão do RORγt é regulada pela sinalização do STAT3, que ocorre através da ativação de células T através do receptor de células T (TCR), TGF-β e receptor de IL-6 (Damsker *et al.*, 2010). A IL-17A e IL-17F ativa vários tipos celulares que incluem fibroblastos, células endoteliais, células epiteliais, queratinócitos e macrófagos, levando a indução da produção de várias citocinas como IL-6, fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), IL-1, fator transformador de crescimento beta (TGF-β), fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), várias quimiocinas e prostaglandinas (PGE2) (Kolls & Linden, 2004; Kotake *et al.*, 1999). Um importante resultado desses efeitos é o estímulo e atração dos neutrófilos para o local da inflamação (Kolls & Linden, 2004).

Desta forma, os linfócitos T desempenham papel central na resposta imune específica contra quaisquer antígenos, inclusive provenientes de patógenos causadores de sepse. O ambiente das citocinas durante a projeção e a conseqüente ativação de fatores de transcrição específicos são dois elementos chave no controle da diferenciação das células T CD4 *naïves* (Zhu & Paul, 2010). Quando ativadas por antígenos, passam a secretar citocinas preferencialmente Th1 (inflamatórias), Th2 (antiinflamatórias) ou Th17

(inflamatórias), dependendo das características do antígeno, das moléculas co-estimulatórias presentes na superfície dos linfócitos T e das células apresentadoras de antígenos. Essa produção de citocinas desencadeará a atividade microbicida de macrófagos, que produzirão outras citocinas, amplificando a resposta imunológica (Bilate & Cunha Neto, 2007).

Outro tipo de células T que atuam no controle da resposta inflamatória atenuando-a é conhecido como linfócitos T regulatórios. As células T regulatórias naturais (nTreg) têm seu desenvolvimento no timo (Sakaguchi, 2004). A sinalização de IL-2 e TGF-β, a co-estimulação de CD28 e o auto-reconhecimento podem ser importantes para a geração das Treg. Ao mesmo tempo em que as células Th17 foram descobertas, foi demonstrado que as células T CD4 *naïve* periféricas com um estimulante de TCR e com as citocinas, TGF-β e IL-2, provocou o aparecimento de células T regulatórias induzidas (iTregs) (Chen *et al.*, 2003). A população de células Treg encontradas *in vivo* consiste em nTreg e iTreg, que expressam o fator de transcrição Foxp3. Tanto as nTreg como as iTreg podem estar envolvidas na autotolerância, imunomodulação e na regulação da resposta imune (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009).

Descoberta recente demonstrou um caminho de desenvolvimento recíproco compartilhado por células Th17 e Treg como a presença de IL-6 que inibe completamente a regulação positiva do Foxp3 e da aquisição de um fenótipo supressivo, o contrário ocorre quando as células T *naïve* são ativadas na presença de TGF-β sozinho (Korn *et al.*, 2008). O efeito combinado de IL-6 e TGF-β impulsiona o compromisso inicial das células T *naïve* ao fenótipo Th17, embora a sinalização continuada de IL-23 seja essencial para a

sobrevivência e manutenção (Mangan *et al.*, 2006). Outra citocina produzida por Th17, a IL-21, membro da família da citocina da IL-2, pode amplificar a resposta de Th17 de forma autócrina e até mesmo substituir a IL-6 na indução de Th17 (Nurieva *et al.*, 2007).

A figura 2 mostra as citocinas que promovem a diferenciação das células T CD4+ e os fatores de transcrição e citocinas característicos de cada linhagem Th1, Th2, Th17 e Treg.

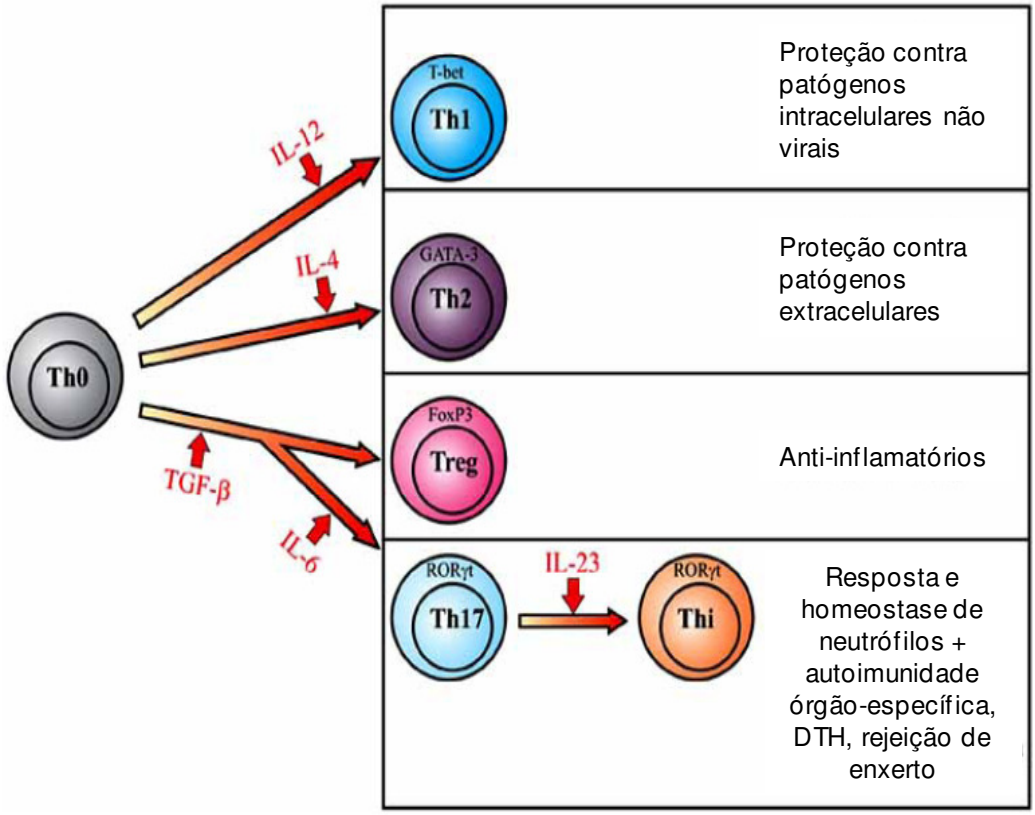

Figura 2: Diferenciação das células T helper (Adaptado de Alber, 2007).

1.5 – Dinâmica da resposta inflamatória na sepse

Sepse é uma síndrome complexa na qual citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias são expressas simultaneamente (Hotchkiss & Karl, 2003). A

resposta inflamatória inicial na sepse é caracterizada pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF-α, IFN-γ, IL-6 e IL-12 (Arnalich *et al*., 1999). O IFN-γ aumenta a função dos macrófagos e possui um papel importante na sepse; tem atividade antiviral, aumenta a atividade do TNF e induz o óxido nítrico (Dinarello, 2000). Em modelo animal foi encontrado níveis elevados de IFN-γ circulantes na sepse (Maina *et al*., 2004). Células apresentadoras de antígenos (APC), incluindo monócitos e macrófagos, células dendríticas e neutrófilos são a principal fonte de IL-12. A IL-12 induz a proliferação celular, a produção de IFN-γ e o aumento da atividade citotóxica de células T e NK. Induz também a polarização das células T CD4+ para o fenótipo Th1 que medeia a imunidade contra patógenos intracelulares (Watford *et al*., 2003). No estudo PROWESS (avaliação do recombinante da proteína C ativada na sepse grave), o nível de IL-6 plasmático em pacientes sobreviventes tratados com placebo foi significativamente menor em relação aos não sobreviventes (Kinasewitz *et al*., 2004). Esses resultados sugerem que a IL-6 é uma citocina chave durante a sepse. Após esta freqüente resposta inflamatória inicial ocorre uma resposta antiinflamatória mais prolongada, caracterizada pela produção de citocinas como IL-10 e IL-4. Neste contexto, Brunialti *et al*. demonstraram que células mononucleares do sangue periférico de pacientes em fase inicial da sepse produzem grande quantidade de IL-6 e TNF-α, enquanto a produção está diminuída em pacientes com sepse grave ou choque séptico (Brunialti *et al*., 2006). A modulação da produção de IL-10 é menos pronunciada e não se observa a elevação e diminuição mencionadas com as citocinas inflamatórias. Desta forma, a última resposta na sepse tem sido

referida como síndrome da resposta compensatória antiinflamatória, incluindo a liberação de IL-10 e fator de crescimento transformador β (TGF-β).

O efeito da produção endógena de IL-10 prejudicou a resposta imune à sepse no pulmão por *Pseudomonas aeruginosa* em modelos experimentais de camundongos (Steinhauser *et al.*, 1999). Parece que, dependendo do modelo experimental, a IL-10 pode ser benéfica ou maléfica (Monneret *et al.*, 2004). O nível de TGF-β foi maior em crianças com doença grave de malária do que com doença moderada (Malaguarnera *et al.*, 2002). Entretanto, o papel do TGF-β na sepse grave ainda é incerto (Wu *et al.*, 2009).

A investigação da sepse sofreu muitos reveses devido a dificuldade encontrada na prática clínica de se aplicar resultados experimentais (Riedemann *et al.*, 2003). Devido a isso, existe a necessidade de ampliar nossa compreensão da fisiopatologia da inflamação e do seu regulamento. Recentemente, novos mediadores foram descobertos, como HMGB-1, abrindo o horizonte para novos alvos terapêuticos promissores (Lotze & Tracey, 2005). A descoberta da família IL-17 apresentou um novo caminho para a interface entre a imunidade inata e adaptativa. Está se tornando claro que a IL-17A, primeiro membro descrito da família IL-17, é um mediador da estimulação de neutrófilos e mobilização de linfócitos T (Kolls & Linden, 2004). Assim, demonstrou estar envolvida em vários processos fisiológicos e patológicos, como granulopedese, defesa contra bactérias, artrite reumatóide, rejeição de enxerto, modulação tumoral, asma e reações alérgicas (Flierl *et al.*, 2008). No contexto da sepse são poucos os artigos que investigaram a importância da IL-17. Em modelo de ligadura e punção do ceco (CLP) em camundongos, Flierl *et al* concluíram que a IL-17A derivada das células Tγδ seriam as responsáveis

pelo aumento da produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, além da bacteremia. Venet *et at.* estudaram por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real o fator de transcrição RORγ em leucócitos totais de pacientes sépticos e os resultados não foram diferentes entre sadios e sépticos (Venet *et al.*, 2010).

Embora alguns estudos descrevam a reposta inflamatória na sepse como bifásica, até agora a maioria deles só mediu os níveis de citocinas em apenas um momento e não no seguimento dos pacientes sépticos (Carrol *et al.*, 2005).

Desta forma, torna-se imperativo a necessidade de mais estudos que caracterizem o papel das células Th17 durante a resposta inflamatória na sepse. O presente estudo vem preencher uma grande lacuna onde se propõe a investigar a população de Th1 e Th17 de pacientes sépticos em relação a indivíduos sadios e no seguimento da sepse.

Hipótese ou Justificativa

2.0 – HIPÓTESE OU JUSTIFICATIVA

Sepse é caracterizada por uma resposta inflamatória modulada nos diferentes estadios, com período inicial exacerbado e fase posterior inibida ou de imunoparalisia. Esse padrão de resposta do sistema imune parece depender da célula e da função avaliada.

As células Th17 pertencem a uma subpopulação de linfócitos T CD4, que têm atividade pró-inflamatória e foram descritas como responsáveis pela condução auto-imune na inflamação. Na sepse ainda não está bem caracterizado o papel destas células durante o período inflamatório. Há grande possibilidade das células Th17 modularem esta resposta inflamatória na sepse.

Na literatura há pouquíssimos trabalhos sobre células Th17 em pacientes com sepse, portanto a realização deste estudo torna-se de grande interesse. Propomos aqui avaliar a porcentagem de células Th17 em pacientes. Para isso, os linfócitos T CD4 foram caracterizados pelo padrão de citocinas no momento da internação e após sete dias de permanência na unidade de terapia intensiva (UTI).

Objetivos

3.0 – OBJETIVOS

Caracterizar as populações celulares Th1 e Th17 através da detecção da produção intracelular de IFN-γ e IL-17A em amostras de pacientes sépticos e compará-las a indivíduos sadios.

Avaliar a dinâmica da produção intracelular de IFN-γ e IL-17 nos pacientes sépticos à admissão e após 7 dias de seguimento.

Avaliar a relação da produção intracelular de IFN-γ e IL-17 no seguimento da sepse (D0 e D7) com o desfecho clínico, sobrevida ou óbito.

Casuística e Métodos

4.0 – CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 – Casuística

4.1.1 – Aspectos éticos e tamanho de amostra:

Foram incluídos no estudo 30 voluntários sadios e 59 pacientes sépticos após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido por ele mesmo ou seu responsável legal. O estudo teve início apenas após aprovação pelo Comitê de Ética do Hospital São Paulo/UNIFESP, Hospital Israelita Albert Einstein e Hospital Sírio Libanês. Os pacientes foram seguidos e uma nova amostra foi coletada após sete dias (D7) da primeira (D0).

4.1.2 – Critérios de Inclusão:

Voluntários: indivíduos sadios, de faixas etárias e gêneros semelhantes ao grupo de pacientes, que não estivessem em uso de medicação e que participassem espontaneamente do estudo.

Pacientes: Foram incluídos pacientes com quadro clínico e laboratorial de sepse, sepse grave ou choque séptico, classificados de acordo com as definições adaptadas do consenso de 1992 (*American College of Chest Physicians/Society of Critical Care* – Bone *et al.*, 1992), admitidos nas unidades de terapia intensiva do Hospital São Paulo, Hospital Sírio Libanês e Hospital Israelita Albert Einstein, na cidade de São Paulo. Os pacientes foram incluídos

nas primeiras 72 horas do diagnóstico de sepse, ou nas primeiras 48 horas do evento definidor de sepse grave ou choque séptico.

4.1.3 – Critérios de exclusão:

1. Pacientes menores de 18 anos ou com doença imunossupressora, como neoplasias ou AIDS.
2. Pacientes que estivessem recebendo alguma terapia experimental.
3. O evento definidor de sepse grave ou choque ocorrido há mais de 48 horas.
4. Pacientes moribundos ou com morte iminente.

Tabela 1: Média de idade dos indivíduos sadios e pacientes sépticos.

Idade		Anos
Indivíduos Sadios	Média	59,96
	Desvio Padrão	16,11
	Mediana	63,0
	Mínimo	22
	Máximo	82
Pacientes	Média	61,72
	Desvio Padrão	16,98
	Mediana	64,0
	Mínimo	19
	Máximo	92

Tabela 2: Porcentagem do gênero dos indivíduos sadios e pacientes sépticos.

Gênero		Porcentagem
Indivíduos Sadios	Feminino	36,7
	Masculino	63,3
Pacientes	Feminino	35,6
	Masculino	64,4

4.2 – Reagentes e estímulos utilizados

- **PBS 0,15M** [8g NaCl (Labsynth, Diadema, SP, Brasil); 0,2g KH_2PO_4 (Labsynth); 1,15g Na_2HPO_4 (Labsynth); 0,2g KCl (Labsynth) diluído em 1 litro de água destilada, pH 7,2].
- **Tampão de Fixação/Permeabilização** [Solução de lise BD Bioscience (San Jose, CA, EUA) diluída para 2 vezes concentrada em água destilada, 0,05% de Tween 20 (Casa Americana de Artigos para Laboratório, São Paulo, SP, Brasil)].
- **Tampão de Fixação** [PBS 1% paraformaldeído (Polysciences Inc., Warrington, PA, EUA), pH 7,4-7,6].
- **Tampão de Marcação** [PBS 2% soro fetal bovino (FCS, Invitrogen Corporation, São Paulo, SP, Brasil), 1% azida sódica (Sigma, Saint Louis, MO, EUA), pH 7,4-7,6].
- ***Trypan Blue*** (Sigma) 0,1% em PBS.
- **Meio de cultura RPMI 1640 autoclavável** pH=7,0 (Sigma) suplementado com 200 mM L-glutamina (Invitrogen Corporation, Calrsbad, CA, EUA), 10 UI/mL penicilina G/estreptomicina sulfatada (Invitrogen Corporation).
- **R10** [RPMI 1% L-glutamina (Invitrogen Corporation), 1% penicilina G/estreptomicina (Invitrogen Corporation), 1% HEPES (Invitrogen Corporation), 1% piruvato de sódio (Invitrogen Corporation), 10% FCS e 0,1% 2-mercaptoetanol (Invitrogen Corporation).
- **Meio de Congelamento** FCS 10% em dimetilssulfóxido (DMSO, Calbiochem, Gibbstown, NJ, EUA).
- **Ionomicina 1mM** (Sigma) em DMSO.

- Forbol-Meristato-Acetato (PMA) (Sigma) diluído em DMSO, concentração final na suspensão celular de 20ng/mL.

- Brefeldina A (solução estoque: 5mg/mL) diluída em DMSO. Solução de uso diluída em PBS estéril: 1mg/mL. Concentração final na suspensão celular: 10µg/mL.

4.3 – Amostras de sangue

Foram coletados 50mL de sangue em tubos a vácuo contendo heparina sódica (BD Bioscience, Plymouth, Inglaterra) de cada indivíduo e as amostras processadas em até quatro horas no Laboratório de Imunologia I da Disciplina de Infectologia da UNIFESP/EPM.

4.4– Métodos

4.4.1 – Separação de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)

O sangue heparinizado foi diluído v:v em soro fisiológico [Áster, Sorocaba, SP, BR]. O sangue diluído foi adicionado sobre ficoll-paque plus [GE Bio-Science, Uppsala, Suécia] e centrifugado a 805g durante 20 minutos em temperatura ambiente. Durante a centrifugação, as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram separadas por meio de uma diferença de gradiente de densidade formando uma "nuvem" de células. As células da "nuvem" foram coletadas e lavadas duas vezes com 50mL de soro fisiológico.

O botão de células foi suspenso em meio de cultura RPMI 1640 suplementado. A viabilidade e ajuste da concentração da suspensão de células foram feitos utilizando-se o corante *trypan blue* e câmara de Neubauer, respectivamente. As células foram novamente centrifugadas e suspendidas em meio de congelamento na concentração de $1x10^7$células/mL. Ao final desta etapa, as células estavam prontas para o congelamento.

4.4.2 – Congelamento das amostras

Alíquotas de um mililitro da suspensão de células acima foram distribuídas em criotubos. Estas foram transferidas para caixas especiais de congelamento celular (*Strata Cooler*, La Jolla, CA, EUA) previamente refrigeradas a 4ºC e mantidas a -80ºC por pelo menos 24 horas. Após este período as amostras foram colocadas em nitrogênio líquido onde permaneceram até a realização dos ensaios.

4.4.3 – Descongelamento das amostras

Assim que retiradas do nitrogênio líquido, as amostras foram colocadas em banho-maria a 37ºC para um rápido descongelamento. Imediatamente, as amostras foram transferidas para tubos de 15mL. As células foram lavadas em 10mL de meio R10 a 37ºC e centrifugadas a 805g por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e as células foram suspensas em 3mL de meio R10. A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o corante

trypan blue e a concentração da suspensão de células ajustada para $1x10^6$células/mL.

4.4.4 – Estimulação *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico

Foram feitas alíquotas de 500µL da suspensão de células na concentração de $1x10^6$cél/mL em tubos de 15mL de polipropileno. As alíquotas foram incubadas a 37ºC em estufa de CO_2 a 5% por 30 minutos após estimulação com PMA/ionomicina. Uma alíquota de cada amostra foi mantida sem estímulo como controle negativo. Após esse período, os tubos receberam brefeldina A e permaneceram incubados por mais 15-16 horas.

4.4.5 – Marcação para detecção intracelular de citocinas em linfócitos

Após a incubação, foram adicionados 2mL de tampão de marcação e a amostra foi centrifugada a 805g por 5 minutos a 4ºC. Desprezados os sobrenadantes, as amostras foram marcadas com anticorpos monoclonais de superfície - CD45, CD8 e CD3 - previamente diluídos em 50µL de tampão de marcação (tabela 3), e incubadas por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente. Uma alíquota da amostra foi mantida sem marcação para ajuste da detecção dos canais de fluorescência e outras alíquotas foram marcadas separadamente com os demais anticorpos citados na tabela 3 para realização da compensação no citômetro de fluxo.

Tabela 3: Anticorpos de superfície e quantidades utilizadas.

Anticorpo	Quantidade*	Clone	Isotipo	Fabricante
CD3 APC[1]	2,0µL	SK7	mouse IgG_{1k}	BD Biosciences
CD8 PerCP[2]	3,5µL	SK1	mouse IgG_{1k}	BD Biosciences
CD45 APC	1µL	HI30	mouse IgG_{1k}	BD Biosciences
CD45 PECy7[3]	1,5µL	HI30	mouse IgG_{1k}	BD Biosciences
CD45 PE[4]	2,5µL	HI30	mouse IgG_{1k}	BD Biosciences

1 – APC: aloficocianina
2 – PerCP: clorofila peridinina
3 – PECy7:ficoeritrina conjugada a cianina 7
4 – PE: ficoeritrina
* o volume foi completado com tampão de marcação para 50µL.

As células foram lavadas em 2mL de tampão de marcação, centrifugadas a 805g por 5 minutos a 4°C. Desprezados os sobrenadantes, as células foram suspendidas em 750µL de tampão de fixação/permeabilização e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente no escuro. Os tubos foram novamente centrifugados e o sobrenadante desprezado. As células receberam 50µL do *pool* de anticorpos anti-IFN-γ e anti-IL-17 para marcação intracelular das citocinas diluído em tampão de marcação (tabela 4) e foram incubadas por 30 minutos no escuro a temperatura ambiente. Após este período, as células foram lavadas em 2mL de tampão de marcação, centrifugadas, o sobrenadante desprezado e as células suspendidas em 100µL de tampão de fixação e finalmente transferidas para microtubos de 1,2mL. Estes foram colocados dentro de tubos de citometria para aquisição no citômetro de fluxo.

Tabela 4: Anticorpos intracelulares e quantidades utilizadas.

Anticorpo	Quantidade	Clone	Isotipo	Fabricante
IL-17A PE	10µL	eBio64CAP17	mouse IgG_{1k}	eBioscience[5]
IFN-γ PECy7	0,6µL	B27	mouse IgG_{1k}	BD Biosciences

5 – e Biosciences: San Diego, CA, USA

4.4.6 – Aquisição e análise de dados para detecção de citocina intracelular

Durante a aquisição dos dados foram utilizados dois gráficos de pontos. O primeiro, de dispersões frontal e lateral de luz, que representam respectivamente, o tamanho e a complexidade das células foi utilizado para determinar uma região P1 de morfologia de linfócitos (figura 3A). Utilizando-se outro gráfico de expressão de CD8 versus expressão de CD3, foi delimitada uma região P2 para eventos positivos para CD3 (figura 3B). Por meio da combinação de P1 e P2 foram adquiridos 70.000 eventos, os quais possuíam, portanto, morfologia de linfócitos e positividade para CD3. Todos os eventos foram salvos. A aquisição dos eventos foi realizada no citômetro de fluxo FACSCanto (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) com auxílio do programa FACSDiva (BD Bioscience).

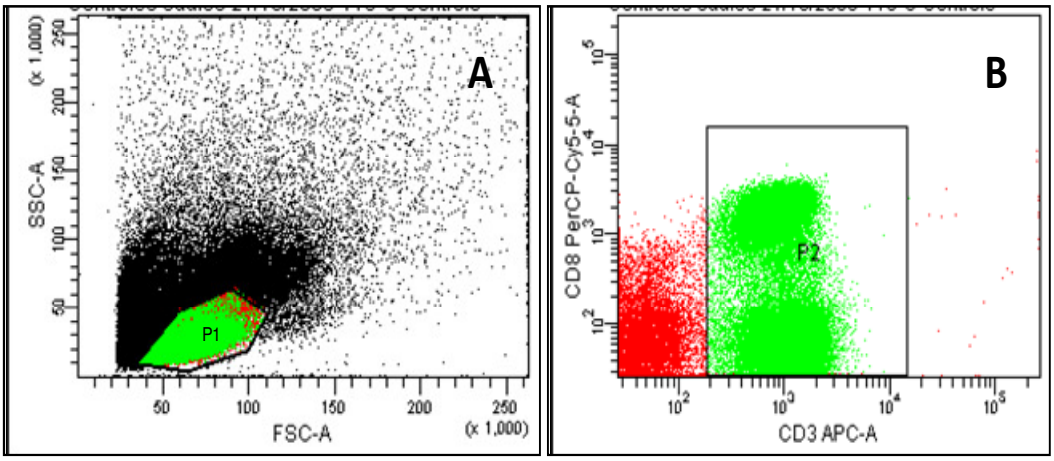

Figura 3: Estratégia de aquisição de linfócitos em CMSP. O gráfico A mostra as dispersões frontal (FSC) e lateral de luz (SSC), correspondendo ao tamanho e complexidade celular, respectivamente. A região P1 separa a população de morfologia de linfócitos. O gráfico B mostra a expressão de CD3 e CD8, onde a região P2 separa os linfócitos CD3+. Foram adquiridos 70.000 eventos combinando-se as regiões P1 e P2.

Para a análise das amostras foi utilizada estratégia semelhante a da aquisição, usando o programa FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EUA), onde a população de linfócitos foi delimitada (figura 4A) e a partir desta identificou-se as populações de linfócitos T CD4 (figura 4B). Considerando que a expressão de CD4 na superfície celular é alterada após estímulo com PMA/ionomicina, optou-se por analisar as células CD3+CD8- como sendo a população de linfócitos T CD4+.

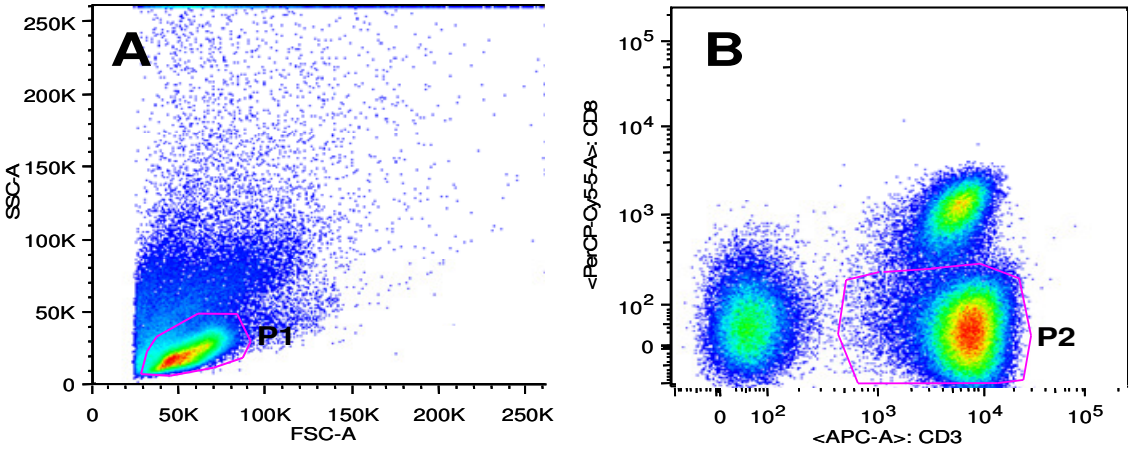

Figura 4: Estratégia de análise da população de linfócitos T CD4 em CMSP. A: Dispersões frontal (FSC) e lateral de luz (SSC) correspondem ao tamanho e complexidade celular, respectivamente, separando a população de morfologia de linfócitos. **B:** Identificação das populações de CD3 e CD8. Na janela P2 foi possível separar os linfócitos CD3+CD8-, que foram analisados como CD3+CD4+.

Após a delimitação das células T CD4 foi possível analisar a produção de IFN-γ e IL-17. A figura 5 mostra o resultado representativo de um indivíduo sem estímulo e com PMA/ionomicina.

Na figura 5A, 99,9% dos eventos estão na região negativa dos fluoróforos utilizados para marcar as citocinas de interesse, pois o controle negativo não recebe estímulo. Após a estimulação com PMA/ionomicina observa-se produção de IFN-γ e IL-17 como mostra a figura 5B.

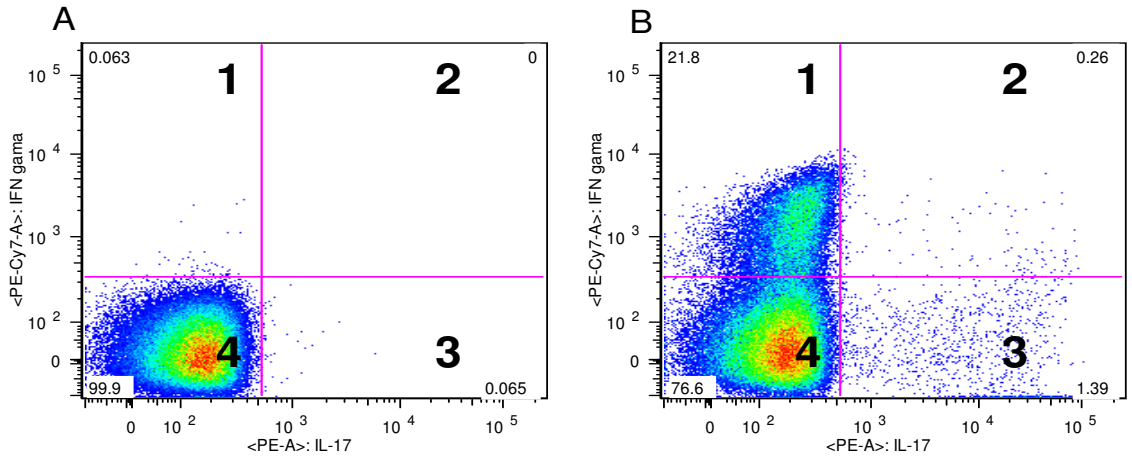

Figura 5: Detecção e análise da produção intracelular de IFN-γ e IL-17 em linfócitos T CD4. Os gráficos **A** e **B** mostram o resultado representativo de um indivíduo, onde **A** é a condição não estimulada e **B** é estimulada com PMA/ionomicina.

Nos gráficos as regiões 1 e 3 mostram a produção intracelular de IFN-γ e IL-17, respectivamente.

4.5 – Citometria de fluxo

A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto equipado com dois laseres, com emissão de comprimentos de onda de 488nm e 633nm. O primeiro laser possibilita a excitação de quatro fluorocromos, FITC, PE, PerCP ou PerCP-Cy5.5 e PE-Cy7, e o segundo excita dois fluorocromos, APC e APC-Cy7. A detecção das fluorescências foi feita em escala logarítmica e detecção de tamanho e complexidade celular em escala linear. A detecção de cada parâmetro e compensação entre os canais de fluorescências foi acertada com marcações individuais. O citômetro é acoplado à unidade constituída por um microcomputador HP Workstation XW4200, que permite controle sobre o citômetro e armazenamento dos dados em arquivos.

4.6 – Análise Estatística

As análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences* v 13.0).

Todas as variáveis foram testadas quanto à sua normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e apresentaram distribuição não-normal.

Para comparação de dados quantitativos entre grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney U. Quando comparamos os dados quantitativos intra-grupo, ou seja, de amostras relacionadas foi realizado o teste de Wilcoxon.

O valor de significância estatística foi estabelecido em 5%, ou $p<0,05$.

Resultados

5.0 – RESULTADOS

A produção de IFN-γ e IL-17 foi avaliada nas condições sem estímulo e após estimulo com PMA/ionomicina na população de linfócitos T CD4+ em indivíduos sadios e pacientes sépticos no primeiro dia de diagnóstico (D0) e após 7 dias de seguimento (D7).

5.1 – Informações clínicas e epidemiológicas dos pacientes sépticos e indivíduos sadios

A média das idades dos 30 indivíduos sadios incluídos foi de 59,9 ± 16,1 anos (tabela 1), sendo 63,3% do gênero masculino (tabela 2).

A idade média dos 59 pacientes incluídos no estudo das três UTIs foi de 61,7 ± 17,0 anos (tabela 1), sendo 64,4% do gênero masculino (tabela 2). De acordo com as definições do consenso de sepse de 1992 (Bone *et al.*; 1992), 2 pacientes apresentavam quadro clínico e laboratorial de sepse, 10 sepse grave e 47 choque séptico.

Os principais focos primários de infecção foram: pulmonar, associada ou não a outra doença, em 23 pacientes; infecção abdominal em 16 pacientes; infecção do trato urinário em 10 pacientes; infecção na corrente sanguínea em 4 pacientes; ferida operatória em 2 pacientes; endocardite em 1 paciente; pele ou partes moles em 3 pacientes. O desfecho clínico foi avaliado em relação à alta hospitalar, onde 40,7% (24) evoluíram para óbito.

5.2 – Produção intracelular de IFN-γ e IL-17 em linfócitos TCD4+

As porcentagens de células T CD4+ produtoras de IFN-γ e IL-17 dos pacientes sépticos e indivíduos sadios estão descritos na tabela 5.

Tabela 5: Porcentagem de linfócitos T CD4+ produtores de IFN-γ ou IL-17.

		IFN-γ (sem estímulo)	*IFN-γ (PMA/ionomicina)*	*IL-17 (sem estímulo)*	*IL-17 (PMA/ionomicina)*
Indivíduos Sadios	n	30	30	30	30
	Média	0,06	21,56	0,12	0,98
	Desvio Padrão	0,02	9,72	0,09	0,44
	Mediana	0,06	21,4	0,11	0,85
	Mínimo	0,01	5,24	0,03	0,36
	Máximo	0,12	43,4	0,48	2,05
Pacientes (D0)	n	59	59	59	59
	Média	0,15	15,11	0,28	1,63
	Desvio Padrão	0,14	12,98	0,24	1,54
	Mediana	0,12	10,4	0,21	1,14
	Mínimo	0,01	0,35	0,02	0,31
	Máximo	0,69	66,4	1,17	10,2

Os linfócitos T CD4+ dos pacientes sépticos apresentaram maior produção de IFN-γ na condição sem estímulo comparado aos indivíduos sadios (p=0,002). Entretanto, após estímulo com PMA/ionomicina, os indivíduos sadios apresentaram maior produção de IFN-γ em relação aos pacientes (p=0,001) (figura 6 A e B).

A produção de IL-17 pelos linfócitos T CD4+ foi maior no grupo de pacientes sépticos que nos indivíduos sadios nas amostras sem estímulo e estimuladas com PMA/ionomicina (p<0,001 e p=0,027, respectivamente) (figura 6 C e D).

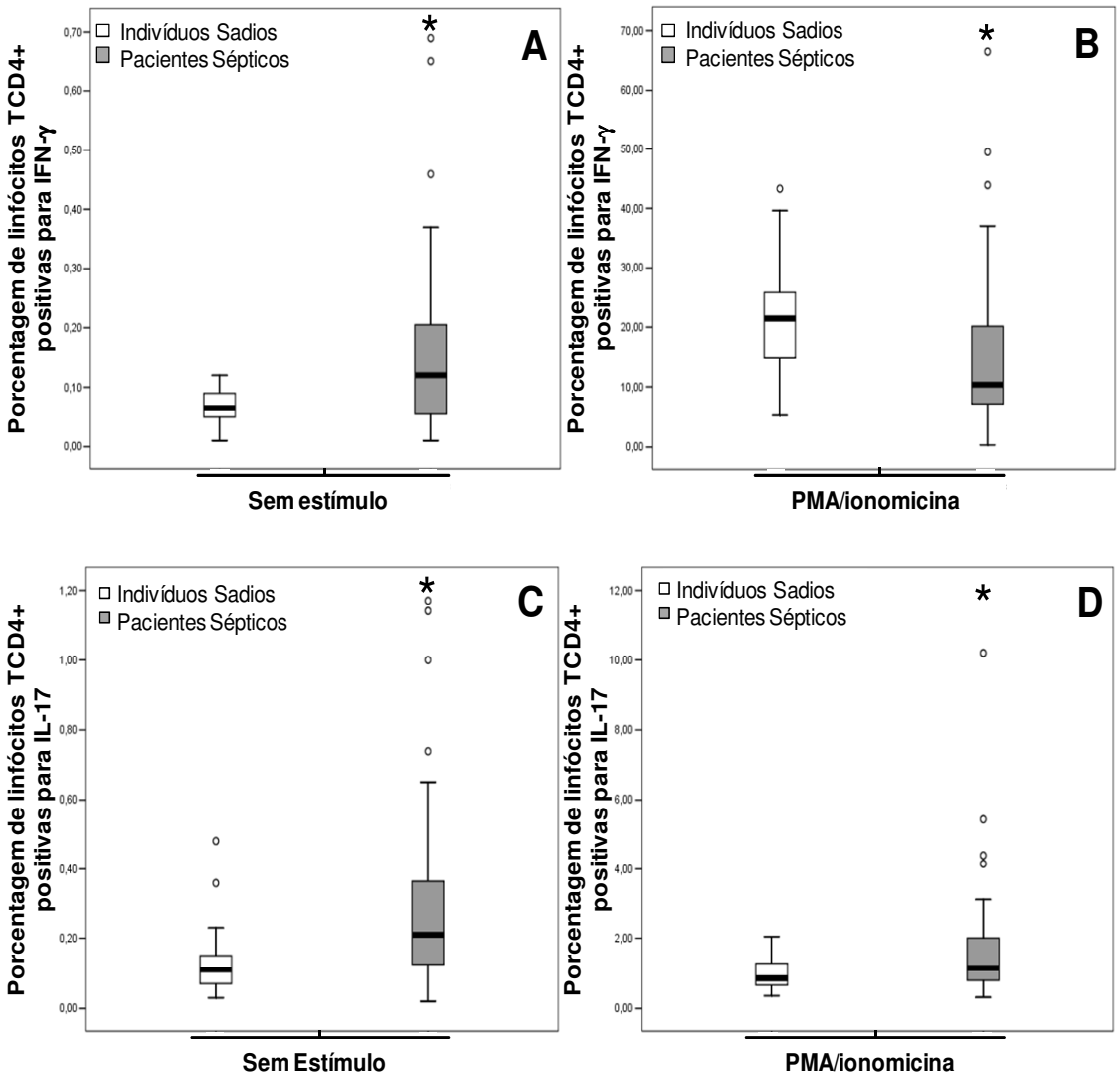

Figura 6: Porcentagem de linfócitos T CD4+ produtores de IFN-γ e IL-17 em CMSP de indivíduos sadios (n=30) e pacientes sépticos (D0, n=59). Os gráficos mostram os percentuais de células produtoras de IFN-γ (gráfico **A** e **B**) e IL-17 (gráfico **C** e **D**). Estão representados os valores máximo e mínimo, os percentis 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). *p<0,05 em relação aos indivíduos sadios na mesma condição (Mann-Whitney *U test*).

5.3 – Avaliação da produção intracelular de IFN-γ e IL-17 nos diferentes estadios da sepse (sepse grave e choque séptico)

A avaliação da produção de IFN-γ e IL-17 na população de linfócitos T CD4+ durante a evolução da sepse está descrita na tabela 6.

A produção de IFN-γ e de IL-17 não mostrou diferença significativa na condição sem estímulo (*p*=0,644 e *p*=0,413, respectivamente) e também após estimulação com PMA/ionomicina para a produção de IL-17 (*p*=0,578) quando comparou-se os diferentes estadios da sepse. Os pacientes em choque séptico apresentaram maior porcentagem de células produtoras de IFN-γ após estímulo com PMA/ionomicina (*p*=0,039) em relação aos pacientes em sepse grave (figura 7).

Tabela 6: Produção de IFN-γ e IL-17 na população de linfócitos T CD4+ em pacientes sépticos nos diferentes estadios da sepse.

Linfócitos T CD4+	n	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
IFN-γ (sem estímulo)						
Sepse Grave	10	0,2	0,2	0,13	0,05	0,65
Choque séptico	47	0,14	0,12	0,12	0,01	0,69
IFN-γ (PMA/ionomicina)						
Sepse Grave	10	8,87	7,72	6,26	1,03	23,1
Choque séptico	47	16,54	13,76	11,8	0,35	66,4
IL-17 (sem estímulo)						
Sepse Grave	10	0,3	0,35	0,16	0,02	1,17
Choque séptico	47	0,28	0,22	0,22	0,05	1,14
IL-17 (PMA/ionomicina)						
Sepse Grave	10	1,43	0,58	1,23	0,81	2,59
Choque séptico	47	1,71	1,69	1,15	0,31	10,2

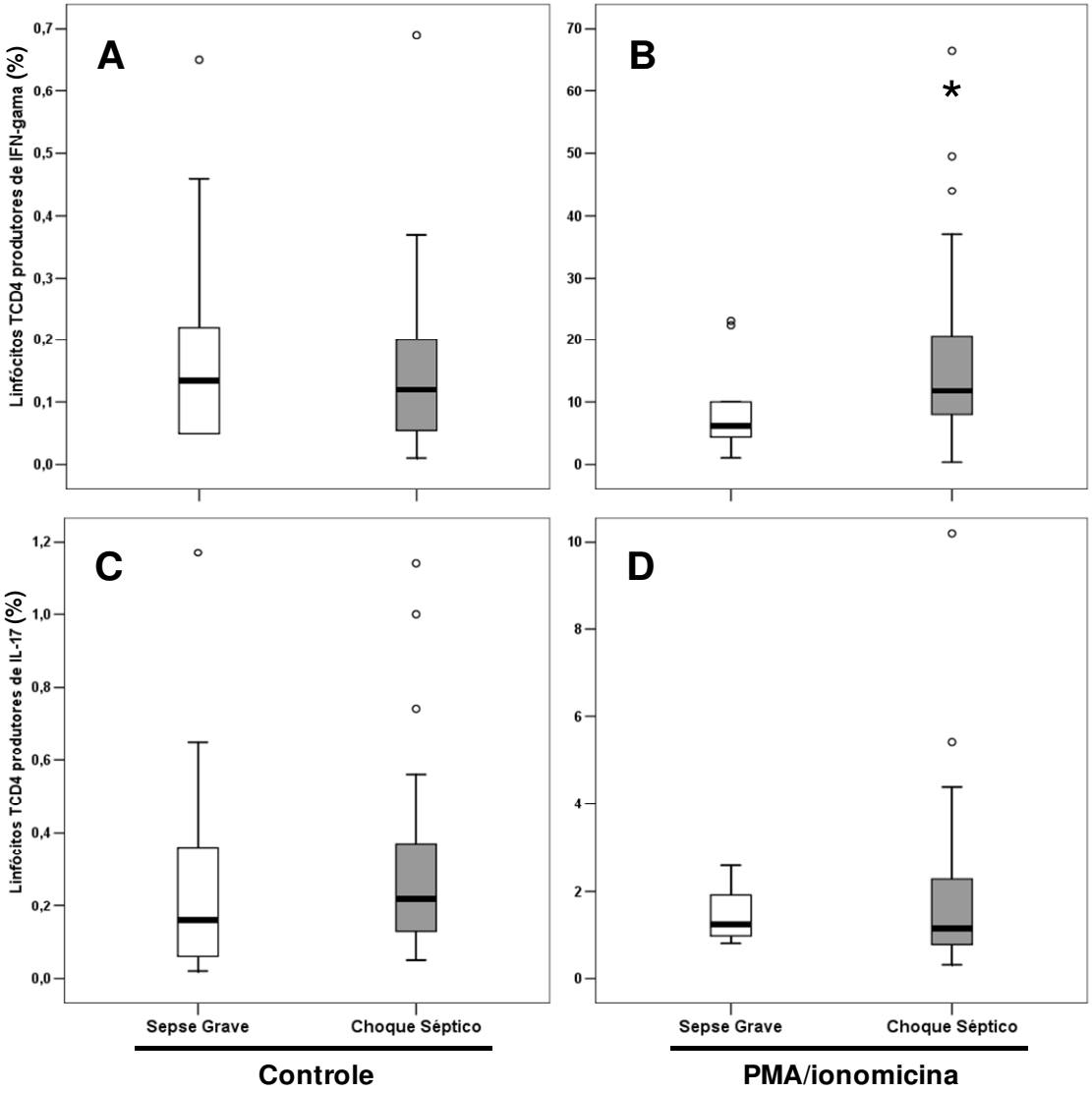

Figura 7: Porcentagem de linfócitos T CD4+ produtores de IFN-γ e IL-17 em CMSP de pacientes sépticos nos diferentes estadios (sepse grave (n=10) e choque séptico (n=47)). Os gráficos mostram os percentuais de células produtoras de IFN-γ (gráficos **A** e **B**) e de IL-17 (gráficos **C** e **D**). Estão representados os valores máximo e mínimo, os percentis 25% e 75% (caixas), medianas dos grupos e valores extremos (círculos) *p<0,05 em relação ao grupo de pacientes em sepse grave (Mann-Whitney *U test*).

5.4 – Avaliação da produção intracelular de IFN-γ e IL-17 no seguimento da sepse (D0 e D7)

A avaliação da produção de IFN-γ e IL-17 na população de linfócitos T CD4+ no seguimento dos pacientes com sepse (D0 e D7) está descrita na tabela 7.

Os resultados mostraram maior porcentagem de linfócitos T CD4 produtores de IFN-γ nas amostras do D7 em relação ao D0, tanto na condição sem estímulo quanto estimulada com PMA/ionomicina (*p*=0,007 e *p*=0,018; respectivamente). Não houve diferença na porcentagem de células produtoras de IL-17 na condição sem estímulo (*p*=0,256). Entretanto, após estímulo com PMA/ionomicina foi observada menor produção no D7 em relação ao D0 (*p*=0,003) (figura 8).

Tabela 7: Porcentagem de linfócitos T CD4+ produtores de IFN-γ e IL-17 em pacientes sépticos nos dias 0 (D0) e dia 7 (D7).

Linfócitos T CD4+		*IFN-γ (sem estímulo)*	*IFN-γ (PMA/ionomicina)*	*IL-17 (sem estímulo)*	*IL-17 (PMA/ionomicina)*
Pacientes D0	n	31	31	31	31
	Média	0,15	15,88	0,31	1,53
	Desvio Padrão	0,13	13,13	0,26	1,0
	Mediana	0,13	10,2	0,27	1,16
	Mínimo	0,01	1,0	0,06	0,4
	Máximo	0,65	49,5	1,17	4,4
Pacientes D7	n	31	31	31	31
	Média	0,29	21,44	0,26	1,07
	Desvio Padrão	0,24	14,86	0,18	0,64
	Mediana	0,17	17,0	0,2	0,92
	Mínimo	0,04	2,2	0,05	0,1
	Máximo	0,99	52,6	0,75	2,8

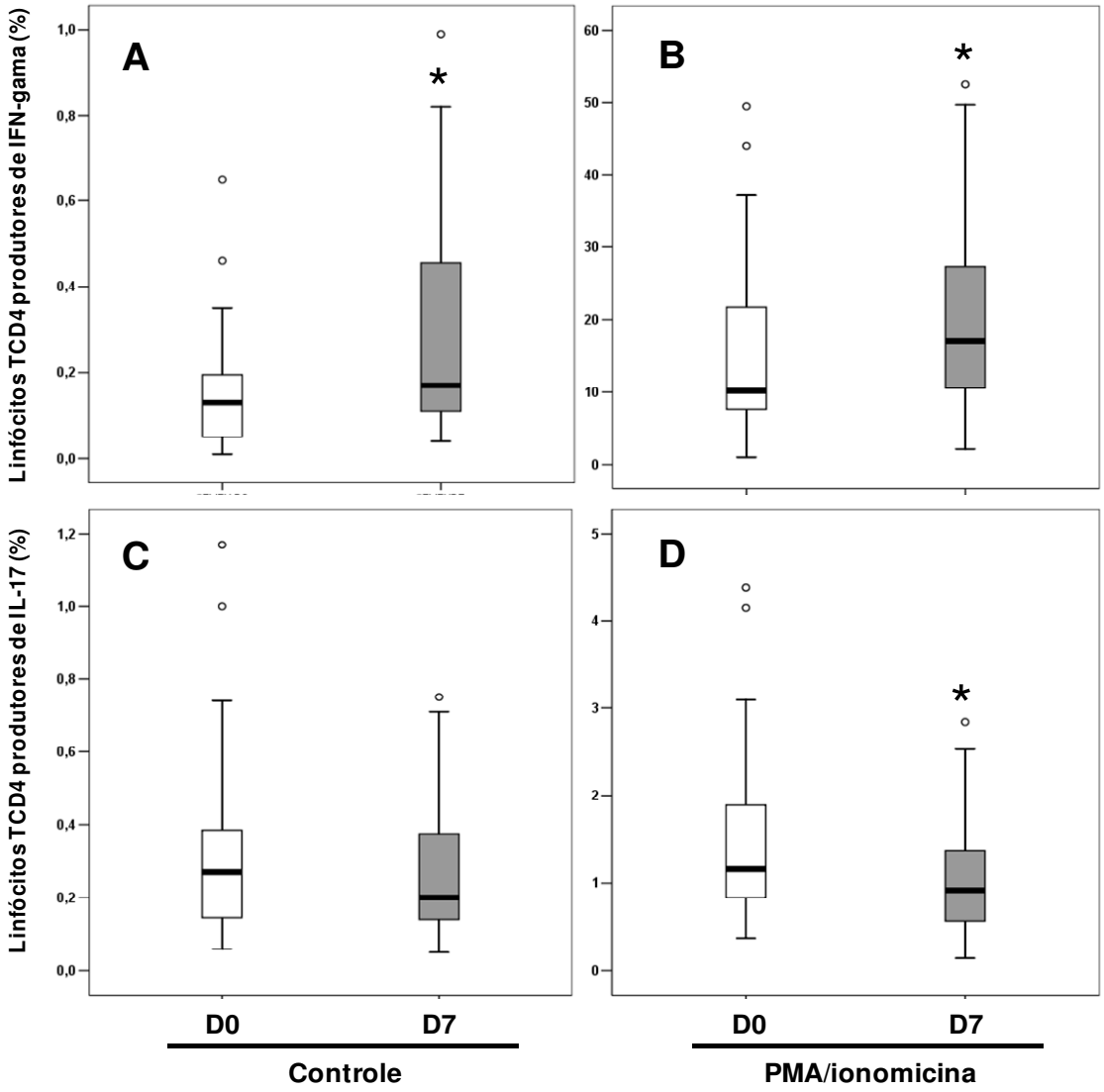

Figura 8: Porcentagem de linfócitos T CD4+ produtores de IFN-γ e IL-17 em CMSP de pacientes sépticos (n=31) nos dias 0 (D0) e 7 (D7) de coleta. Os gráficos mostram os percentuais de células produtoras de IFN-γ (gráficos **A** e **B**) e de IL-17 (gráficos **C** e **D**). Estão representados os valores máximo e mínimo, os percentis 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). *p<0,05 em relação ao D0 na mesma condição (Wilcoxon *test*).

5.5 – Avaliação da produção intracelular de IFN-γ e IL-17 por linfócitos T CD4+ nas amostras D0 e D7 em relação ao desfecho clínico hospitalar

Nas amostras D0 foi avaliada a produção de IFN-γ e IL-17 em linfócitos T CD4+ em relação ao desfecho clínico dos pacientes, ou seja, sobrevida ou óbito (tabelas 8 e 9).

A porcentagem de linfócitos T CD4+ produtores de IFN-γ e IL-17 na condição sem estímulo não mostrou diferença entre os dois grupos (p=0,588 e p=0,081, respectivamente). Também não houve diferença na produção de IFN-γ e IL-17 após estimulação com PMA/ionomicina (p=0,294 e p=0,871, respectivamente) nas amostras do dia zero dos pacientes que evoluíram a óbito em relação aos sobreviventes (figura 9).

Resultados semelhantes foram obtidos nas amostras do dia sete, onde as porcentagens de linfócitos T CD4+ não foram diferentes para a detecção intracelular de IFN-γ e IL-17 na condição sem estímulo (p=0,200 e p=0,860, respectivamente) e estimulada com PMA/ionomicina (p=0,653 e p=0,377, respectivamente) entre os pacientes sobreviventes e não sobreviventes (figura 10).

Tabela 8: Porcentagem de linfócitos T CD4+ produtores de IFN-γ e IL-17 de pacientes sépticos no dia 0 de coleta (D0) em relação ao desfecho clínico.

Pacientes D0		*IFN-γ (sem estímulo)*	*IFN-γ (PMA/ionomicina)*	*IL-17 (sem estímulo)*	*IL-17 (PMA/ionomicina)*
Sobrevivente	n	17	17	17	17
	Média	0,12	17,5	0,27	1,71
	Desvio Padrão	0,07	11,32	0,18	1,05
	Mediana	0,13	13,45	0,24	1,33
	Mínimo	0,04	4,34	0,06	0,61
	Máximo	0,23	37,1	0,74	4,15
Óbito	n	14	14	14	14
	Média	0,16	15,84	0,40	1,48
	Desvio Padrão	0,17	15,95	0,32	1,02
	Mediana	0,13	10,25	0,3	1,22
	Mínimo	0,01	1,03	0,09	0,38
	Máximo	0,65	49,5	1,17	4,39

Tabela 9: Porcentagem de linfócitos T CD4+ produtores de IFN-γ e IL-17 de pacientes sépticos no dia 7 de coleta (D7) em relação ao desfecho clínico.

Pacientes D7		*IFN-γ (sem estímulo)*	*IFN-γ (PMA/ionomicina)*	*IL-17 (sem estímulo)*	*IL-17 (PMA/ionomicina)*
Sobrevivente	n	17	17	17	17
	Média	0,17	23,55	0,21	0,97
	Desvio Padrão	0,12	14,65	0,14	0,49
	Mediana	0,12	20,5	0,17	0,92
	Mínimo	0,04	3,82	0,05	0,31
	Máximo	0,51	52,6	0,5	2,09
Óbito	n	14	14	14	14
	Média	0,38	20,91	0,26	1,21
	Desvio Padrão	0,30	16,6	0,18	0,81
	Mediana	0,30	16,75	0,21	1,12
	Mínimo	0,09	2,15	0,06	0,14
	Máximo	0,99	49,7	0,75	2,84

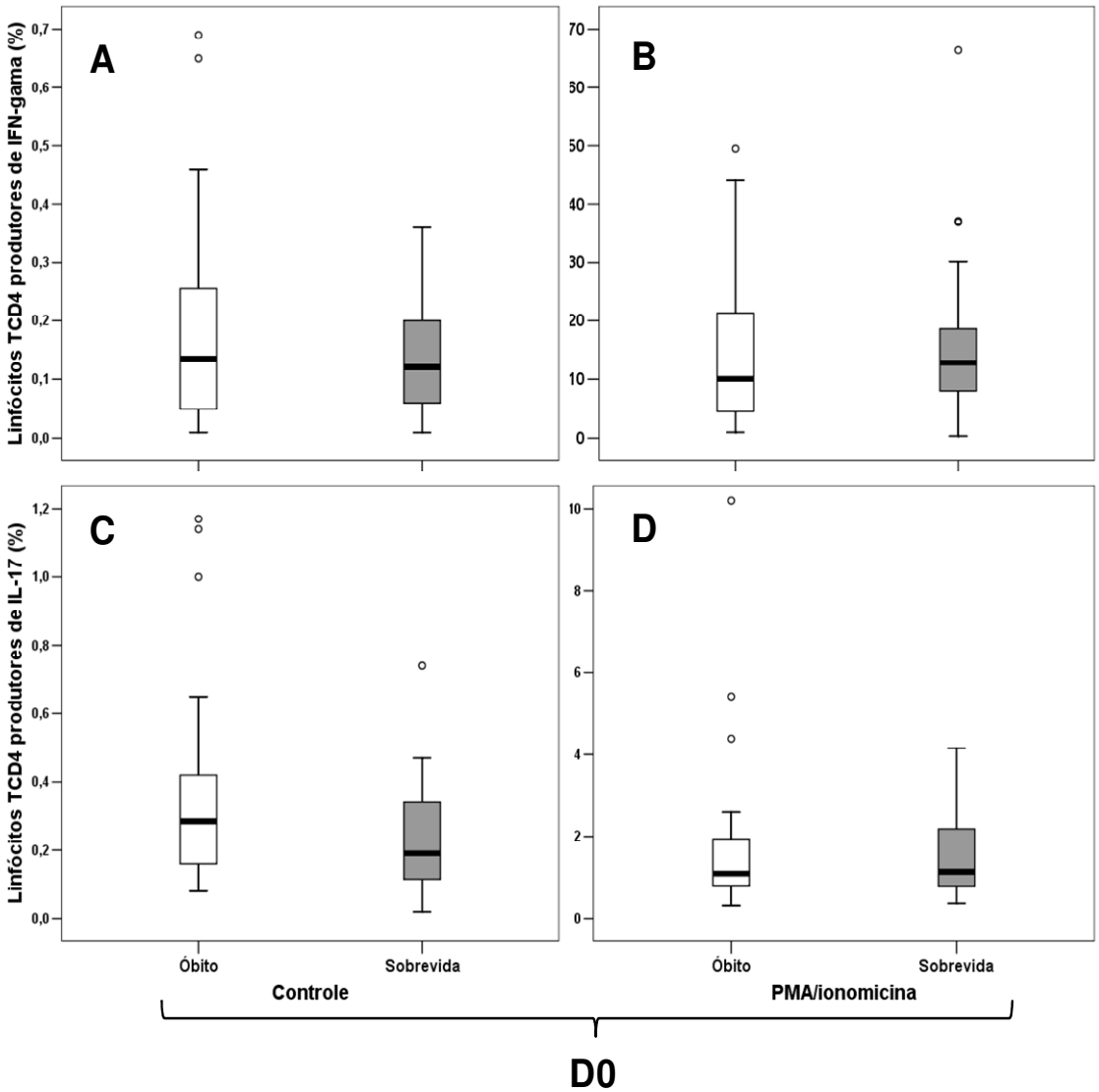

Figura 9: Porcentagem de linfócitos T CD4+ produtores de IFN-γ e IL-17 em CMSP de pacientes sépticos (D0, n=59) que sobreviveram (n=35) e evoluíram para óbito (n=24). Os gráficos mostram os percentuais de IFN-γ (**A**-basal e **B**-PMA/ionomicina) e IL-17 (**C**-basal e **D**-PMA/ionomicina). Estão representados os valores máximo e mínimo, os percentis 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). (Mann-Whitney *U test*).

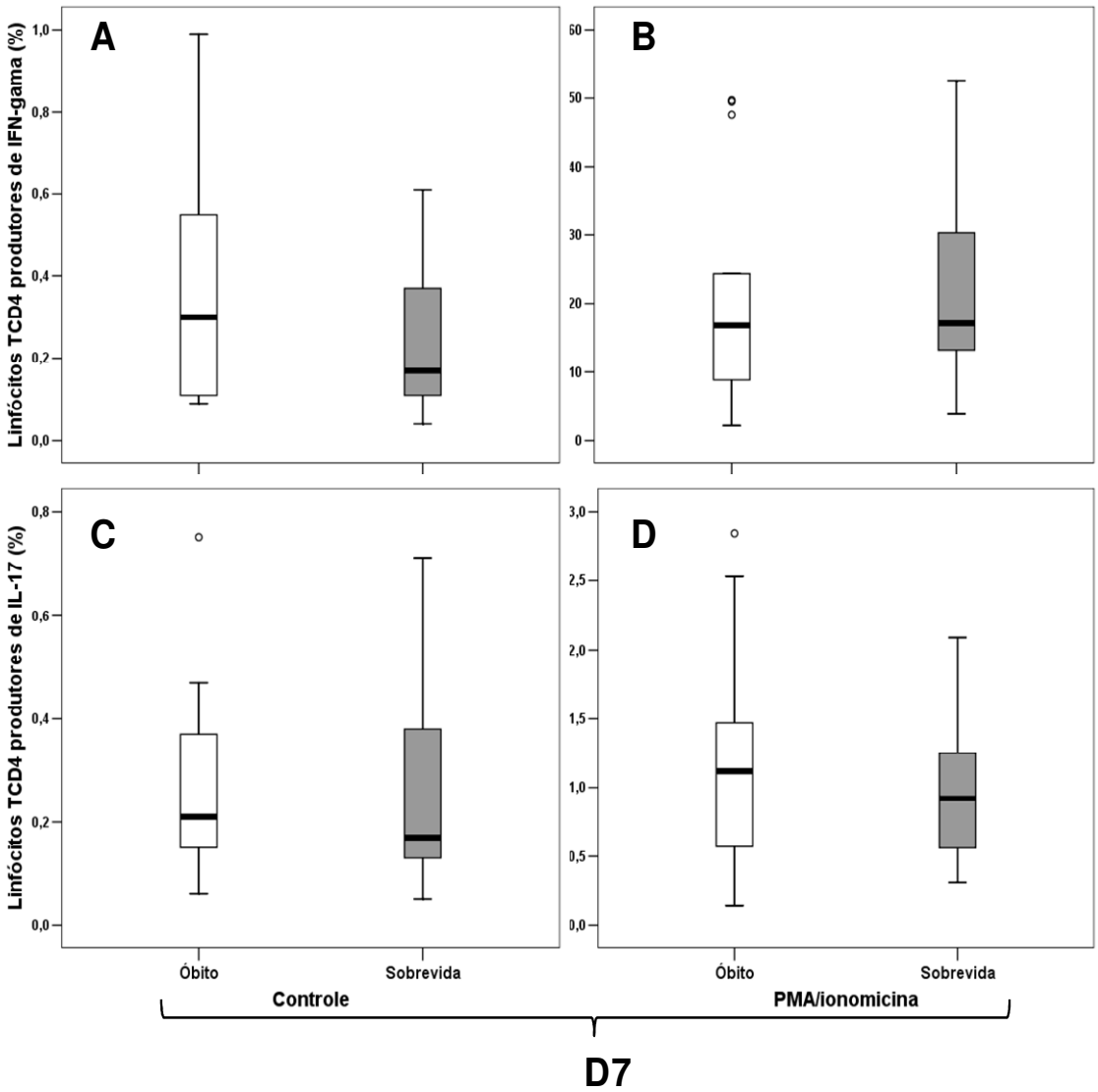

Figura 10: Porcentagem de linfócitos T CD4+ produtores de IFN-γ e IL-17 em CMSP de pacientes sépticos (D7, n=31) que sobreviveram (n=17) e evoluíram para óbito (n=14). Os gráficos mostramos percentuais de células produtoras de IFN-γ (**A**-basal e **B**-PMA/ionomicina) e de IL-17 (**C**-basal e **D**-PMA/ionomicina). Estão representados os valores máximo e mínimo, os percentis 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). (Mann-Whitney *U test)*.

5.6 – Avaliação da produção intracelular de IFN-γ e IL-17 comparando-se sobrevida e óbito no seguimento da sepse (D0 e D7)

A produção de IFN-γ e IL-17 na população de linfócitos T CD4+ no seguimento da sepse (D0 e D7) entre pacientes que sobreviveram e evoluíram a óbito no momento do desfecho clínico está descrita nas tabelas 8 e 9, respectivamente.

Empregando-se o teste para análise de amostras relacionadas, a produção de IFN-γ foi maior na coleta D7 do que na D0 nos pacientes que evoluíram para óbito na condição sem estímulo (p=0,023). Entretanto, não se diferencia após estímulo com PMA/ionomicina (p=0,187). Não houve diferença significativa na produção de IFN-γ nas amostras do D7 em relação às amostras do D0 dos pacientes que sobreviveram, tanto na condição sem estímulo como após estímulo com PMA/ionomicina (p=0,118 e p=0,068, respectivamente) (figura 11).

Não houve diferença significativa na produção de IL-17, na condição sem estímulo, entre as amostras do D0 e do D7 dos pacientes que sobreviveram (p=0,981). Houve diminuição na produção de IL-17 nas amostras dos pacientes que sobreviveram após estímulo com PMA/ionomicina quando se comparou a coleta do dia 7 (D7) com a do dia 0 (D0) (p=0,028). A produção de IL-17 dos pacientes que evoluíram a óbito na condição sem estímulo e após estímulo com PMA/ionomicina não apresentou diferença significativa (p=0,084 e p=0,177, respectivamente) (figura 12).

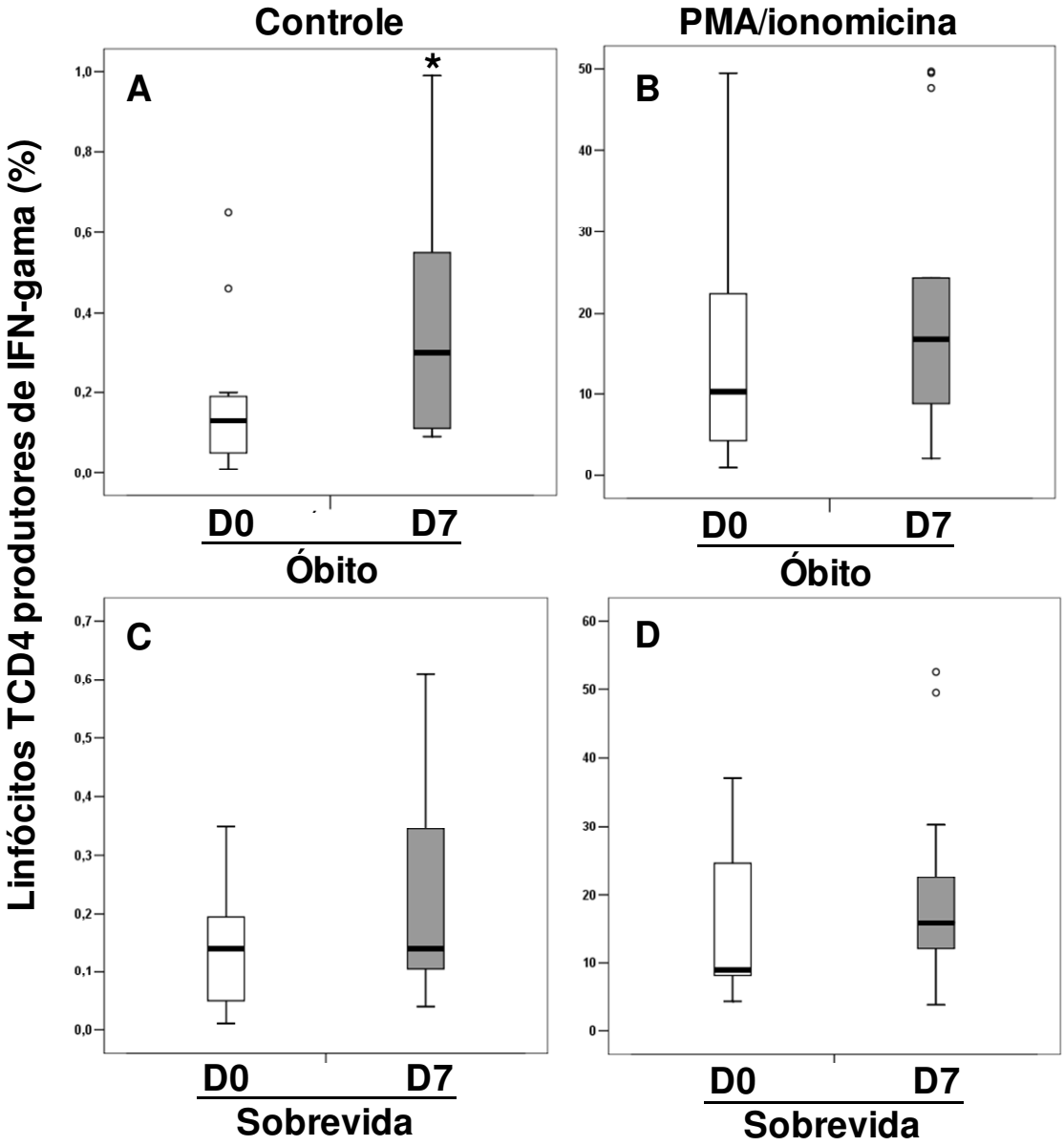

Figura 11: Porcentagem de linfócitos T CD4+ produtores de IFN-γ no dia zero e sete de pacientes sobreviventes (n=17) e não sobreviventes (n=14). Os gráficos mostram os percentuais de células produtoras de IFN-γ (A, B, C e D). Estão representados os valores máximos e mínimos, os percentis 25% e 75% (caixas), medianas dos grupos e valores extremos (círculos). *p< 0,05 em relação ao D0 na mesma condição (*Wilcoxon test*).

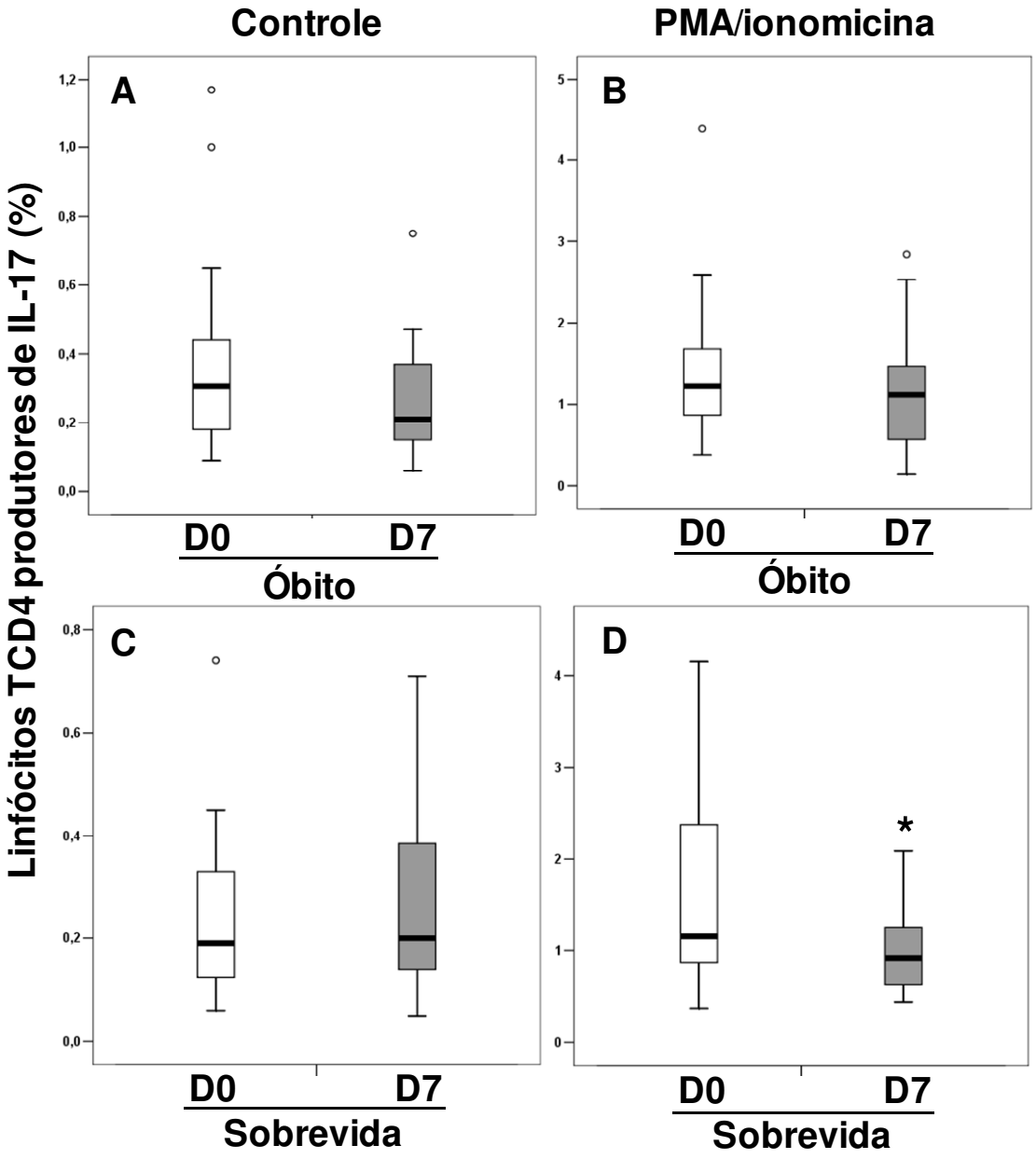

Figura 12: Porcentagem de linfócitos T CD4+ produtores de IL-17 no dia zero e sete de pacientes sobreviventes (n=17) e não sobreviventes (n=14). Os gráficos mostram os percentuais de células produtoras de IL-17 (A, B, C e D). Estão representados os valores máximos e mínimos, os percentis 25% e 75% (caixas), medianas dos grupos e valores extremos (círculos). *p< 0,05 em relação ao D0 na mesma condição (*Wilcoxon test*).

Discussão

6.0 – DISCUSSÃO

Na sepse ocorre um desequilíbrio no controle do sistema imunológico que leva à falência de múltiplos órgãos, seguida de morte. Os mecanismos adaptativos da resposta imune inflamatória do hospedeiro são importantes para o melhor controle da infecção e ainda devem ser elucidados, assim como as principais alterações funcionais, que são a base fisiopatológica das manifestações clínicas (Bilate & Cunha Neto, 2007).

O conceito de que as células Th17 possuem papel importante na resposta inflamatória durante a doença autoimune foi estabelecido quando se demonstrou que a EAE foi induzida pela transferência passiva de IL-17 produzida por células T CD4 de memória ativadas (Langrish *et al.*, 2005).

Neste trabalho, as células Th1 e Th17 foram caracterizadas após detecção da produção intracelular de IFN-γ e IL-17 em CMSP por citometria de fluxo. Cuidados especiais foram tomados para obtenção das amostras dos indivíduos sadios. Essas foram colhidas nos mesmos centros onde foram admitidos os pacientes, desta forma submetida às mesmas condições de transporte e processamento das amostras dos pacientes.

Nossos resultados mostram um aumento das células produtoras de IFN-γ e IL-17 na condição basal nos pacientes em relação aos indivíduos sadios, o que reflete um estado de ativação do sistema imune desencadeado pela sepse. Após estimulação com PMA/ionomicina a produção de IFN-γ foi menor e a produção de IL-17 foi maior nos pacientes sépticos em relação aos indivíduos sadios. Dessa forma, diante de um estímulo exógeno potente, a resposta predominantemente Th1 está diminuída e Th17 está aumentada na sepse. Em

nosso entendimento, este é um dos primeiros trabalhos a mostrar este padrão de resposta em pacientes sépticos por detecção intracelular de citocina.

Recentemente, Venet *et al*. (2010) verificaram a presença das células Th17 por qRT- PCR em pacientes com choque séptico. Observaram expressão significativamente reduzida do fator de transcrição RORγt nos pacientes comparados com o grupo de indivíduos sadios. Esta diminuição foi medida em sangue total no momento da inclusão e durante 48 horas de acompanhamento. Entretanto, quando normalizado com base no número de linfócitos T CD4+ para cada paciente, o fator de transcrição estava dentro da variação dos valores dos voluntários sadios.

Em modelo experimental de sepse, Flierl *et al*. (2008) avaliaram o nível plasmático de IL-17 em fase inicial da sepse induzida por CLP em camundongos e detectaram aumento progressivo de IL-17, atingindo o pico máximo após 12 horas da CLP e retornando aos níveis basais após 24 horas.

Estudos avaliando a presença de IL-17 e sua correlação com atividade ou gravidade de doença são mais comuns em doenças auto-imunes. Yang *et al*. (2009) isolaram CMSP e fragmentos de tecido cutâneo e pulmonar de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e avaliaram a presença de células produtoras de IL-17. Foi observada a presença de uma população significativa de células positivas para IL-17 nas amostras de pacientes com LES quando comparado aos indivíduos saudáveis, sugerindo que as células Th17 estão presentes nas CMSP e em locais de atividade da doença. Também obtiveram células positivas para IFN-γ, mas em menor escala, em relação a IL-17 (Yang *et al*. 2009). Interessante, houve modulação da produção de IL-17 conforme a atividade da doença e a instituição de terapia específica. Em outro

estudo realizado com pacientes portadores de Dermatite Atópica (DA) o número de células T CD4 positivas para IL-17 também foi maior nos pacientes graves em relação aos saudáveis (Koga *et al*. 2008). Esses resultados são semelhantes ao encontrado por nós, onde a porcentagem de células Th17 foi maior no grupo de pacientes sépticos em relação aos sadios, na condição basal e após estímulo com PMA/ionomicina.

Foi demonstrado neste estudo que os pacientes em choque séptico tiveram maior produção de IFN-γ após estimulação com PMA/ionomicina em relação ao grupo de sepse grave. A proporção de células Th17 não diferiu entre esses dois grupos. É interessante observar que pacientes em choque séptico apresentem aumento de células Th1, já que se conhece que pacientes em estadios mais avançados da sepse tendem a estar com comprometida resposta imune celular (Brunialti *et al*., 2006; Hotchkiss & Opal 2010). O balanço das células Th1/Th17 foi estudado por Koga *et al*. (2008) em pacientes com Dermatite Atópica (DA). Os pacientes foram separados em 3 grupos de diferentes gravidades (leve, moderada e grave), sendo a porcentagem de células Th17 significativamente diferente entre eles. Verificaram também que a IL-17 foi maior na fase aguda em relação às lesões crônicas, enquanto que o IFN-γ não apresentou diferença. Em pacientes com LES houve correlação entre o percentual de Th17 e o escore de atividade da doença (SLEDAI) (Yang *et al*., 2009). Estes achados sugerem que o percentual de Th17 está associado com a atividade e gravidade dessas doenças auto-imunes. O fato de não termos encontrado diferença entre grupos de pacientes com sepse grave e choque séptico pode refletir que nesses estadios o estímulo de diferenciação para Th17 já foi saturado. A impossibilidade de analisar pacientes com sepse sem

disfunção orgânica, pouco representados em nossa coorte, pode ter contribuído para a ausência de diferença de Th17 nos estágios da sepse.

Para avaliar a dinâmica dos linfócitos Th1 e Th17 nos pacientes sépticos, foram avaliadas amostras obtidas na admissão no estudo e após 7 dias de intervenção terapêutica. Observou-se maior produção de IFN-γ nas amostras do dia 7 dos pacientes nas condições basal e após estímulo com PMA/ionomicina em relação ao dia zero, enquanto foi encontrada menor produção de IL-17 no D7 em relação ao D0 após estímulo com PMA/ionomicina. Esses resultados parecem refletir uma busca de retorno à homeostasia, já que na admissão os percentuais de linfócitos T CD4 produtores de IFN-γ estavam diminuídos e o de linfócitos T CD4 produtores de IL-17 aumentados após estímulo com PMA/ionomicina nos pacientes em relação aos voluntários sadios e o aumento de detecção de IFN-γ e diminuição de IL-17 no sétimo dia aproxima os resultados dos pacientes com os indivíduos sadios.

Ao questionar se a porcentagem de células Th17 poderia variar no mesmo indivíduo em relação ao estado da doença, Yang *et al.* (2009) testaram seis indivíduos com LES longitudinalmente e constataram uma diminuição significativa na porcentagem de células Th17 após tratamento. Em conjunto, estes autores demonstraram que a proporção de células Th17 e a capacidade de produção de IL-17A são reforçadas no LES ativo, sugerindo que a população de células Th17 pode ser ampliada como resultado de atividade de LES, especialmente a vasculite.

O percentual de linfócitos TCD4 positivos para IFN-γ e IL-17 nas amostras do D0 e D7 foi analisado em relação ao desfecho clínico, sobrevida

ou óbito hospitalar. A produção de IFN-γ, na condição basal, dos pacientes que evoluíram a óbito foi maior no D7 em relação ao D0, enquanto a produção após PMA/ionomicina foi semelhante. Por outro lado, foi observada menor produção de IL-17 após estímulo com PMA/ionomicina nas amostras D7 dos pacientes que sobreviveram quando comparado as do D0. Assim, o aumento da resposta Th1 entre os dias 0 e 7 mostrou-se deletéria e a queda de Th17 foi benéfica, ou seja, uma diminuição da resposta inflamatória foi associada a melhor sobrevida na nossa coorte de pacientes sépticos.

Não há dados clínicos associando produção de IL-17 com evolução na sepse. Em estudo experimental para investigar o papel da IL-17A em sepse induzida por CLP, Flierl *et al*. (2008) administraram anticorpo monoclonal neutralizante para IL-17A no momento da CLP, após 6 horas e após 12 horas e notaram melhora da sobrevida em CLP após tratamento anti-IL-17A mesmo quando administrada após 12 horas. Há evidências de que a IL-17 seja a principal citocina relacionada com patogenicidade em doenças inflamatórias auto-imunes como a EAE e CIA. Nesse contexto, Luger *et al*. (2008) avaliaram se a neutralização da IL-17 *in vivo* por anticorpos monoclonais anti-IL-17 poderia afetar o desenvolvimento da EAU. Constataram que a neutralização da IL-17 durante todo o curso de doença (a partir do dia 1) ou apenas durante a fase efetora (a partir do dia 7) foi altamente protetora. Assim, estudos experimentais de doenças auto-imunes e de sepse por CLP apontam para um efeito patogênico da IL-17 nessas condições.

Estudos experimentais e clínicos avaliando linfócitos na sepse apontam para uma importante depleção dessas células em animais e em pacientes sépticos. A diminuição da população linfocitária foi associada à maior

mortalidade e a prevenção de sua depleção por apoptose foi protetora (Hotchkiss *et al*., 2001). Mais recentemente, demonstrou-se que a queda dos linfócitos na circulação de pacientes com sepse reflete diminuição de suas subpopulações (linfócitos T, linfócitos B e células NK) (Venet *et al*., 2010). Todavia, estudos funcionais baseados na produção de citocinas e que traduzem diferenciação dos linfócitos T CD4 são raros e, nesse contexto, nossos resultados apontam para padrão diferenciado de regulação das subpopulações Th1 e Th17.

A função biológica da IL-17A promovendo a interface entre a imunidade adaptativa e a inata a torna importante alvo de pesquisa em doenças auto-imunes e doenças infecciosas. O melhor conhecimento de sua participação na patogênese das doenças pode caracterizar sua modulação como alvo terapêutico na sepse e outras doenças inflamatórias.

Conclusão

7.0 – CONCLUSÃO

O aumento de células produtoras de IFN-γ e IL-17 na condição basal dos pacientes sépticos reflete o grau de inflamação desencadeado pela sepse. Após estímulo exógeno potente (PMA/ionomicina), a produção de IFN-γ foi menor e a de IL-17 maior nos pacientes em relação aos indivíduos sadios, evidenciando regulação diferenciada das populações Th1 e Th17 nos pacientes sépticos.

Pacientes com choque séptico apresentaram maior produção de IFN-γ após estimulação com PMA/ionomicina que pacientes com sepse grave. Dessa forma, apesar dessa resposta estar comprometida em relação aos indivíduos sadios, esse dado contraria a expectativa de que pacientes em estadios mais avançados da sepse tendem a estar com a resposta Th1 comprometida. Não foi encontrada diferença na produção de IL-17 entre sepse grave e choque séptico, e isso pode refletir que o estímulo para diferenciação de Th17 já tenha sido saturada.

A produção de IFN-γ aumentada e de IL-17 diminuída nas amostras do dia 7 em comparação com as amostras do dia 0 indica que a resposta inflamatória tende a voltar aos valores normais, uma vez que no dia 0 a produção de IFN-γ estava diminuída e de IL-17 aumentada em relação aos voluntários sadios, sugerindo mecanismo de regulação da resposta inflamatória durante o episódio de sepse.

No desfecho clínico hospitalar, não foi encontrada diferença entre pacientes que evoluíram a óbito e sobreviventes, nas amostras do D0 e também nas amostras do D7.

O aumento da população Th1 na condição basal foi maior no dia 7 em relação ao dia 0 nos pacientes que evoluíram a óbito. Situação semelhante foi encontrada após estímulo com PMA/ionomicina. A população de células Th17 após estímulo de PMA/ionomicina foi menor no dia 7 em relação ao dia 0 nos pacientes que sobreviveram. Esses dados indicam que a persistência da resposta Th1 aumentada foi deletéria e a queda de Th17 foi benéfica, ou seja, com a diminuição da resposta inflamatória ao longo do processo infeccioso houve melhora na sobrevida dos pacientes sépticos.

Anexos

8.0 – ANEXOS

Tabela 10: Gênero e idade dos voluntários sadios (1 de 2).

Voluntário sadio	*Idade*	*Gênero*
101-C	46	M
102-C	69	F
103-C	81	M
104-C	58	M
105-C	76	M
106-C	76	F
107-C	82	M
108-C	70	F
109-C	64	M
110-C	74	M
113-C	53	M
114-C	33	F
115-C	62	M
116-C	75	F
117-C	28	M
118-C	22	F
119-C	58	M
120-C	49	F
121-C	72	M
122-C	48	M
123-C	35	F
125-C	73	M
127-C	66	M
129-C	70	M
130-C	71	F
131-C	49	F
133-C	62	M

Voluntário sadio	*Idade*	*Gênero*
134-C	51	M
135-C	76	F
137-C	50	M

Tabela 11: Informações clínicas e epidemiológicas dos pacientes sépticos (1 de 2).

Paciente	*Idade*	*Gênero*	*Estadio*	*Foco Infeccioso*	*SOFA*	*APACHE*	*Alta hospitalar*
101-0	78	M	Choque Séptico	Pneumonia	09	14	Óbito
102-0	72	F	Choque Séptico	Pneumonia	07	14	Óbito
103-0	59	M	Sepse Grave	Pneumonia	03	13	Óbito
104-0	84	M	Choque Séptico	Pneumonia	11	28	Vivo
105-0	65	M	Choque Séptico	Pneumonia	05	17	Óbito
106-0	44	M	Choque Séptico	Inf. Corrente Sanguínea	10	20	Óbito
107-0	82	M	Choque Séptico	Pneumonia	06	23	Vivo
108-0	78	F	Choque Séptico	Pele ou partes moles	04	17	Vivo
109-0	53	M	Choque Séptico	Pneumonia / Inf. Abdominal	07	22	Óbito
110-0	51	F	Choque Séptico	Pneumonia	05	35	Óbito
111-0	19	F	Choque Séptico	Pneumonia	05	14	Vivo
112-0	92	M	Choque Séptico	Infecção Abdominal	02	21	Vivo
113-0	73	M	Choque Séptico	Infecção Urinária	05	19	Óbito
114-0	49	M	Choque Séptico	Infecção Abdominal	07	19	Vivo
115-0	69	M	Sepse Grave	Pele ou partes moles	05	19	Vivo
116-0	50	M	Choque Séptico	Pneumonia	10	12	Vivo
117-0	71	M	Choque Séptico	Infecção Urinária	06	23	Vivo
118-0	66	F	Sepse Grave	Infecção Urinária	02	19	Vivo
119-0	87	F	Choque Séptico	Infecção Abdominal	06	25	Vivo
121-0	74	M	Choque Séptico	Infecção Urinária	03	11	Óbito
126-0	49	M	Choque Séptico	Pneumonia	09	16	Vivo
127-0	75	F	Sepse Grave	Infecção Urinária	05	33	Vivo
128-0	71	M	Choque Séptico	Pneumonia	07	17	Óbito
129-0	77	M	Choque Séptico	Pneumonia / Inf.urinária	06	24	Óbito
130-0	78	M	Choque Séptico	Infecção Abdominal	11	25	Vivo
131-0	68	M	Choque Séptico	Ferida Operatória	13	26	Óbito
132-0	51	F	Choque Séptico	Pneumonia	09	13	Óbito
133-0	57	M	Sepse Grave	Inf. Corrente Sanguínea	05	12	Óbito
134-0	75	F	Choque Séptico	Infecção Abdominal	09	19	Óbito
136-0	75	F	Choque Séptico	Infecção Abdominal	10	18	Vivo

Paciente	Idade	Gênero	Estadio	Foco Infeccioso	SOFA	APACHE	Alta hospitalar
137-0	45	M	Choque Séptico	Pneumonia	10	15	Vivo
138-0	58	M	Choque Séptico	Infecção Abdominal	14	19	Óbito
139-0	53	F	Choque Séptico	Inf. Corrente Sanguínea	10	20	Vivo
144-0	78	M	Choque Séptico	Infecção Abdominal	03	22	Vivo
145-0	53	M	Sepse Grave	Pneumonia	09	13	Óbito
146-0	57	M	Choque Séptico	Pneumonia	10	14	Óbito
147-0	37	F	Choque Séptico	Infecção Abdominal	07	32	Vivo
148-0	45	M	Choque Séptico	Pele ou partes moles	08	14	Vivo
149-0	32	F	Sepse	Infecção Urinária	00	07	Vivo
150-0	71	M	Choque Séptico	Pneumonia	06	19	Vivo
151-0	52	M	Choque Séptico	Infecção Abdominal	12	23	Óbito
152-0	33	F	Choque Séptico	Infecção Urinária	13	16	Vivo
153-0	43	M	Sepse	Infecção Abdominal	00	11	Vivo
154-0	52	M	Choque Séptico	Infecção Abdominal	14	24	Vivo
155-0	58	M	Choque Séptico	Infecção Abdominal	13	24	Vivo
156-0	75	M	Choque Séptico	Pneumonia	09	18	Óbito
157-0	55	M	Choque Séptico	Pneumonia	09	10	Vivo
158-0	78	F	Sepse Grave	Infecção Urinária	00	06	Óbito
159-0	80	F	Sepse Grave	Infecção Urinária	07	18	Vivo
160-0	40	F	Choque Séptico	Pneumonia	14	28	Vivo
161-0	76	M	Choque Séptico	Infecção Abdominal	08	22	Óbito
162-0	82	F	Choque Séptico	Pneumonia	14	20	Óbito
163-0	56	F	Choque Séptico	Endocardite	13	20	Vivo
165-0	81	F	Sepse Grave	Infecção Urinária	09	26	Vivo
166-0	52	M	Choque Séptico	Inf. Corrente Sanguínea	05	13	Óbito
167-0	64	M	Choque Séptico	Pneumonia	12	22	Vivo
168-0	30	M	Sepse Grave	Ferida Operatória	08	10	Vivo
169-0	81	M	Choque Séptico	Infecção Abdominal	04	14	Vivo
172-0	24	F	Sepse Grave	Infecção Urinária	01	11	Vivo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

AVALIAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS TH1 E TH17 EM PACIENTES SÉPTICOS E RELAÇÃO COM O DESFECHO CLÍNICO

Pesquisadores responsáveis:

Michelle Carolina dos Santos

Reinaldo Salomão

Sepse é uma doença conhecida como infecção generalizada causada por microorganismos (bactérias, fungos, vírus), e pode levar o paciente à morte em até 60% dos casos, o que mostra a importância de entendermos melhor os mecanismos que podem causá-la.

Existem várias células do corpo humano (por exemplo: monócitos, neutrófilos) participando no processo de defesa frente a esses microorganismos invasores, dentre estes microorganismos destacam-se as bactérias Gram-negativas que apresentam em sua membrana externa o LPS, cujo efeito fisiopatológico assemelha-se com as manifestações clínicas da sepse.

Basicamente, os objetivos desse estudo são:

1. Avaliar a presença de células Th17, através da expressão dos resceptores CCR2, CCR5 e CCR6 na superfície de linfócitos T, no sangue periférico de pacientes sépticos nos dias 0, 7, 14 e 28 de internação em UTI ou alta hospitalar.

2. Caracterizar células Th17 através da detecção intracelular das citocinas IFN-γ e IL-17A após estimulação *in vitro* de amostras de pacientes sépticos no dia zero de coleta.

COLETA DE SANGUE: será coletada amostra de 50mL de sangue coletadas em tubo a vácuo contendo HEPARINA de 40 pacientes sépticos e 20 voluntários sadios. Serão incluídos prospectivamente pacientes com quadro clínico e laboratorial de sepse, sepse grave ou choque séptico, classificados de acordo com as definições adaptadas do consenso de 1992, admitidos no Hospital São Paulo, Hospital Sírio Libanês, Hospital Albert Einstein e Hospital Santa Marcelina, na cidade de São Paulo. Os pacientes serão incluídos nas primeiras 72 horas do diagnóstico de sepse, ou nas primeiras 48 horas do evento definidor de sepse grave ou choque séptico. Os pacientes serão seguidos e serão colhidas outras amostras de sangue no 7º, 14º, 28º dia após a primeira coleta ou alta hospitalar. Os voluntários sadios serão pareados por gênero e idade, que não estejam em uso de medicação e que participem espontaneamente do estudo, serão recrutados nos hospitais descritos acima ou via comunicação pessoal e a coleta do material será feita no Laboratório de Virologia e Imunologia 1 - DIPA.

RISCOS: os riscos são mínimos e o único procedimento que pode acarretar algum desconforto ao participante é a coleta do sangue. A coleta é feita através de uma agulha que penetra em uma veia do braço. O desconforto pode ser pela dor local da picada e, raramente, pela formação de pequeno hematoma. A coleta será realizada por profissionais experientes.

POTENCIAIS BENEFÍCIOS NA PARTICIPAÇÃO DESTE ESTUDO: Não há benefício direto para o participante desse estudo. Porém, os resultados desses

exames poderão ajudar a compreender os mecanismos que causam a infecção, podendo assim abrir caminho para novos estudos sobre essa doença, como o organismo humano se defende e por vezes orientar o tratamento.

CONFIDENCIALIDADE: Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade do voluntário a todo o momento.

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas: Michelle Carolina dos Santos que pode ser encontrada no Laboratório de Virologia e Imunologia I, sito à Rua Pedro de Toledo, 781 – 15º andar, pelo telefone 5081-5394. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 - 1º andar cj 14. Fone: 5571-1062 – Fone/Fax: 5539-7162.

Após assinar o consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar.

Não há qualquer ônus financeiro para o voluntário que participar do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Os dados e o material coletado somente serão utilizados para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li, descrevendo a “AVALIAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS TH1 E TH17 EM PACIENTES SÉPTICOS E RELAÇÃO COM O DESFECHO CLÍNICO”.

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.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

_____ data ___/___/___

Voluntário

_____ data ___/___/___

Pesquisador Principal

UNIFESP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO/HOSPITAL SÃO PAULO

Data: 01-06-2009 11:20:02
Pagina 1/2
id = 712

São Paulo, 29 de Maio de 2009
CEP 0345/09

Ilmo(s). Sr(a).
Pesquisador(a) Michelle Carolina dos Santos
Co-Investigadores: Michelle Carolina dos Santos; Milena Karina Coló Brunialti; Flavia Machado; Otelo Rigato; Eliezer Silva; Reinaldo Salomão;
Disciplina/Departamento Infectologia da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador Fapesp

CARTA DE APROVAÇÃO E PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado:
'Caracterização de Linfócitos Th17 na Sepse'

ÁREA TEMÁTICA ESPECIAL: Não há necessidade de envio à CONEP para análise

CARACTERISTICA DO ESTUDO: Estudo coorte

RISCO PACIENTE: Risco mínimo, desconforto leve, envolvendo coleta de sangue

OBJETIVOS: Avaliar a presença de células Th17, através da expressão dos receptores CCR2, CCR5 e CCR6 na superfície de linfócitos T, no sangue periférico de pacientes sépticos nos dias 0, 7, 14 e 28 de internação em UTI ou alta hospitalar. Caracterizar células Th17 através da detecção intracelular das citocinas IL17A e IFN gama após estimulação in vitro de amostras de pacientes sépticos no dia zero da coleta.

RESUMO: Serão incluídos no estudo 20 voluntários sadios e 40 pacientes sépticos, admitidos no Hospital São Paulo, Santa Marcelina, Hospital Albert Einstein e Hospital Sirio Libanês. A coleta de sangue para realização dos ensaios laboratoriais deverá ser feita em até 72 horas depois do início da sepse ou 48 horas de manifestada a primeira disfução orgânica nos pacientes com sepse grave/choque séptico. Serão separadas células mononucleares do sangue periférico, e realizada imunofenotipagem de linfócitos Th17 através da citometria de fluxo. Células mononucleares serão estimuladas in vitro para detecção intracelular de citocinas, com marcadores para superfície e citocinas intracelular.

FUNDAMENTAÇÃO RACIONAL: As células Th17 é uma subpopulação de linfócitos T CD4 que tem atividade pró-inflamatória, responsáveis pela condição autoimune na inflamação. Como a sepse tem um período de inflamação, essas células podem ter papel importante nesse contexto.

MATERIAL E METODO: Estão descritos os procedimentos a serem realizados, utilizando metodologia de domínio do laboratório.

DETALHAMENTO FINANCEIRA: A apresentação do orçamento detalhado permitiu a análise econômica viabilizando assim, a realização do projeto.

CRONOGRAMA: 24 meses

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado

PRIMEIRO RELATÓRIO PREVISTO PARA: 03/06/2010, os demais relatórios deverão ser entregues ao CEP anualmente até o termino do estudo

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Rua Botucatu, 572 - 1º andar - conj 14. CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539 - 7162

UNIFESP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO/HOSPITAL SÃO PAULO

Data: 01-06-2009 11:20:02
Pagina 2/2
id = 712

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Inflamm. Res. (2010) 59 (Suppl 1):S1–S8
DOI 10.1007/s00011-010-0169-5

Inflammation Research

8th World Congress on
Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis

in conjunction with

23rd SIS-Europe Congress on Surgical Infections

and the

2nd Interdisciplinary Summit on Inflammation

TSIS 2010

March 9th–13th 2010, Munich, Germany

Book of Abstracts

TSIS 2010

A 133

Preserved detection of IL-17 and reduced detection of IFN-gamma in lymphocytes tCD4 in septic patients compared to healthy volunteers

Milena Brunialti[1], Santos M[1], Machado F[2], Otelo Rigato[1,3], Reinaldo Salomao[1]

[1]Infectious Diseases Discipline, Universidade Federal de Sao Paulo, [2]Discipline of Anesthesiology, Sao Paulo Hospital, Universidade Federal de Sao Paulo, [3]Intensive Care Unit, Sirio Libanes Hospital

Objective: Inflammatory response is modulated during sepsis and up and down regulation of cellular activity is observed, depending on the cells and functions evaluated. IFN-g and IL-17, cytokines characteristics of Th1 and Th17 lymphocytes subpopulations, play an important role in immune response, linking adaptative and innate immunity. The aims of this study were to evaluate the presence of these cells in septic patients compared to healthy volunteers and their association with prognosis.

Patients and methods: Thirty three patients with sepsis and eighteen healthy volunteers were included. The mean ages were 66.5 ± 15.4 and 60.3 ± 19.0 years, respectively. Twenty eight days mortality was 33%. The peripheral blood mononuclear cells were frozen and stored in liquid nitrogen. After thawed cell suspension was adjusted to 1×0^6 cells/mL and stimulated with PMA/ionomycin at 37°C and 5% CO_2 for 30 min. Brefeldin A was added to inhibit protein secretion and samples were incubated for further 15 h. An aliquot without stimulus was kept as negative control. Cells surface were stained to identify the population of lymphocytes CD3+CD8+ (TCD8) and CD3+CD8− (TCD4). The samples were permeabilized, intracellular stained to detected IL-17A and IFN-g and acquired in the FACSCanto flow cytometry. Data analysis was performed in the FlowJo software.

Results: Basal production of IFN-g and IL-17A was increased in TCD4 cells of septic patients when compared with healthy volunteers ($P = 0.05$ and $P = 0.001$, respectively). The percentage of TCD4 cells producing IFN-g after PMA/ionomycin stimulus was increased in the group of healthy volunteers when compared with patients ($P = 0.038$). IL-17A production did not differ between groups ($P = 0.078$). The proportion of TCD4+ producing IL-17 and IFN-g after PMA/ ionomycin did not differ between survivors and non-survivors ($P = 0.661$ and $P = 0.117$, respectively).

Conclusion: The basal results with greater cytokines production in patients than in controls reflect the degree of inflammation characteristic of the sepsis. The lower percentage of TCD4 lymphocytes producing IFN-g after PMA/ionomycin is similar and may be related to the hyporesponse observed in monocytes during severe sepsis and septic shock, as previously described by ours and others. In contrast, the Th17 response was preserved in septic patients, suggesting a regulatory mechanism of lymphocyte subsets during sepsis that may influence innate inflammatory response. Financial support: Capes and Fapesp grant 06/58744-1

Corresponding Author: Milena Brunialti, PhD, Universidade Federal de São Paulo, Department of Medicine/Infectious Disease, Rua Pedro de Toledo, 781 15th floor, 4039032 São Paulo, Brasil, milena.brunialti@unifesp.br

A 134

Increased proportion of alternatively activated macrophages in septic patients compared to healthy volunteers

Milena Brunialti[1], Maria Fernandes[1], Eliezer Silva[2], Otelo Rigato[3], Reinaldo Salomao[1]

[1]Infectious Disease Discipline, Federal University of São Paulo, [2]Discipline of Anesthesiology, Sao Paulo Hospital, [3]Intensive Care Unit, Sirio Libanes Hospital

Objective: Macrophages, monocytes and polymorphonuclear cells from innate immune system are the first defense against infection. These cells have a central role in the development of inflammatory response in sepsis syndrome. Nowadays it is clear that monocytes/macrophages response is modulated during sepsis. As example, monocytes from septic patients can produce small amount of pro-inflammatory cytokines after LPS challenged in vitro, while in the same conditions the production of anti-inflammatory cytokines are preserved. A phenotype of alternatively activated macrophages, expressing CD206 or CD163, has been characterized as macrophages producing anti-inflammatory cytokines. The aim of this study was investigated the percentage of alternatively activated macrophages in the sepsis syndrome compared to healthy volunteers.

Patients and methods: Thirty three patients with sepsis and twenty healthy volunteers (HV) were included. The means ages were 67.5 ± 17.3 and 59.20 ± 18.44 in patients group and healthy volunteers, respectively. Twenty eight days mortality was 36.4%. The peripheral blood mononuclear cells were frozen and stored in liquid nitrogen. After thawed the cell viability was checked with trypan blue solution in Neubauer chamber. An aliquot of 4×10^5 cells was stained on their surface with CD14, CD163 and CD206 during 15 min at room temperature in the dark. Isopype controls were used for CD206 and CD163. The samples were washed with 2 mL of facs buffer (PBS, 0.1% BSA and 2.0 mM EDTA) and resuspended in fixation buffer (PBS, 0.1% paraformaldehyde). The data were acquired and analyzed in FACSCanto flow cytometry and FlowJo software, respectively. Twenty thousand events were acquired in CD14+ gate.

Results: Septic patients presented increased percentage of monocytes expressing CD206 and CD163 compared to HV ($P < 0.001$ in both cases). The mean of percentage of CD206 positive monocytes in patients and HV were 3.82 ± 3.75 and 0.56 ± 0.72, respectively. In the same way, percentage of CD163 positive monocytes from septic group showed a significant increase compared with HV, mean of percentage 28.14 ± 21.11 and 0.65 ± 1.21, respectively.

Conclusion: There was a significant increase of alternatively activated macrophages in septic patients. These results showed that modulation of monocytes/macrophages function can be investigated by CD206 and CD163 surface expression during the sepsis syndrome, and not only by anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokine detection. Finantial support: Fapesp grant 2008/07511-2 and 2006/58744-1.

Corresponding Author: Milena Brunialti, PhD, Universidade Federal de São Paulo, Department of Medicine/Infectious Disease, Rua Pedro de Toledo, 781 15th floor, 4039032 São Paulo, Brasil, milena.brunialti@unifesp.br

A 135

In vitro effect of evodiamine on dendritic cells in inducing allogeneic T cell responses

Huaping Liang, Xia Fan, Qiang Wei, Xue Yang, Xi Wang

Objective: Dendritic cells (DCs) are professional antigen-presenting cells in the initiation and regulation of immune responses. Evodiamine, the major alkaloidal component isolated from Chinese herbal drug named Wu–Chu–Yu, exhibits various biological effects including anti-inflammatory activity. In this study, we detected the in vitro effect of evodiamine on murine bone marrow-derived dendritic cells in inducing allogeneic T cell responses.

Methods: Immature dendritic cells (iDC) derived from bone marrow of BALB/c mice were induced by GM-CSF for ten days in culture and received evodiamine, LPS, evodiamine + LPS treatment for another 24 h. then their capacity in inducing allogeneic T cell responses were determined by mixed lymphocyte reaction (MLR), expression of MHC class II, CD40, CD80, and CD86 on DC surface were measured using flow cytometry, and the cytokines in DC supernatants were

CERTIFICATE

The
TSIS 2010 – A. E. Baue-Travel Award

has been awarded to

Milena Brunalti
Sao Paulo/Brasil

for a scientific abstract entitled

Preserved Detection of IL-17 and Reduced Detection of IFN-Gamma in Lymphocytes TCD4 in Septic Patients Compared to Healthy Volunteers

presented at the
8th World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis
TSIS 2010
from March 09th to 13th, 2010
at the Ludwig-Maximilians-University of Munich
Campus Grosshadern
in Munich, Germany

TSIS 2010

IMUNO 2010

XXXV Congress of the Brazilian Society for Immunology
III ESCI - Extra Section in Clinical Immunology
Effector Immune Responses and Viral Immunity
PORTO ALEGRE - RIO GRANDE DO SUL - BRAZIL

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

Balance of Th17, Th1 and T regulatory lymphocytes in septic patients compared to healthy volunteers and association with hospital outcome

foi apresentado no XXXV Congress of the Brazilian Society for Immunology, realizado de 03 a 06 de novembro de 2010 em Porto Alegre, Rio Grande do Sul na qualidade de poster, tendo como autores:

BRUNIALTI, Milena Karina Colo; SANTOS, Michelle Carolina; MACHADO, Flávia Ribeiro; RIGATO, Otelo; SILVA, Eliézer; SALOMAO Reinaldo.

Porto Alegre, 06 de novembro de 2010.

Realização

SBI Sociedade Brasileira de Imunologia

João Santana da Silva
President of the Brazilian Society for Immunology

Cristina Bonorino
President of the XXXV Congress of the Brazilian Society of Immunology

Referências Bibliográficas

9.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK; Lichtman AH; Pober JS. Processamento dos Antígenos e Apresentação aos Linfócitos T. In: Imunologia Celular e Molecular. 4ª edição. (2003) 79-100.

Alber G; Kamradt T. Regulation of protective and pathogenic Th17 responses. Cur. Immunol. Rev. 2007; 3: 3-16.

Angus DC; Linde-Zwirble WT; Lidicker J; Clermont G; Carcillo J; Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med 2001; 29: 1303-1310.

Ansel KM; Djuretic I; Tanasa B; Rao A. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. Annu Rev Immunol 2006; 24: 607-656.

Arnalich F; Lopez J; Codoceo R; Jim NM; Madero R; Montiel C. Relationship of plasma leptin to plasma cytokines and human survivalin sepsis and septic shock. J Infect Dis 1999; 180: 908-911.

Bilate AMB; Cunha Neto E. Linfócitos T. In: Sepse. 1ª edição. (2007). 250-257.

Bone RC; Sibbald WJ; Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. Chest 1992; 101(6): 1481-3.

Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and autcome of severe sepsis in French intensive care units. Intensive Care Med 2004; 30: 580-588.

Brunialti MK, Martins PS, Barbosa de Carvalho H, Machado FR, Barbosa LM, Salomão R. TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. Shock. 2006 Apr; 25 (4): 351-7.

Carrol ED; Thomson AP; Jones AP; Jeffers G; Hart CA. A predominantly anti-inflammatory cytokines profile is associated with disease severity in meningococcal sepsis. Intensive Care Med 2005; 31: 1415-1419.

Chen W; Jin W; Hardegen N; *et al*. Conversion of peripheral $CD4^+CD25^-$ naive T cells to $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells by TGF-β induction of transcription factor Foxp3. J Exp Med 2003; 198: 1875-1886.

Cua DJ; Hinton DR; Stohlman SA. Selfantigen-induced Th2 responses in experimental allergic encephalomyelitis (EAE)-resistant mice. Th2-mediated suppression of autoimmune disease. J Immunol 1995; 155: 4052-4059.

Curotto de Lafaille MA; Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3$^+$ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? Immunity 2009; 30: 626-635.

Damsker JM; Hansen AM; Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. Ann N Y Acad Sci 2010; 1183: 211-221.

Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. Chest 2000; 118: 503-508.

Esteban A; Frutos-Vivar F; Ferguson ND; Penuelas O; Lorente JA; Gordo F *et al*. Sepsis incidence and outcome: contrasting the intensive care unit with the hospital ward. Crit Care Med 2007; 35: 1284-1289.

Engel C; Brunkhorst FM; Bone HG; Brunkhorst R, Gerlach H; Grond S; *et al*. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective milticenter study. Intensive Care Med 2007; 33: 606-618.

Ferber IA; Brocke S; Taylor-Edwards C; Ridgway W; Dinisco C; Steinman L; Dalton D; Fathman CG. Mice with a disrupted IFN-γ gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). J Immunol 1996; 156: 5-7.

Flierl MA; Rittirsch D; Gao H; Hoesel LM; Nadeau BA; Day DE; Zetoune FS; Sarma JV; Huber-Lang MS; Ferrara JLM; Ward PA. Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis. The FASEB Journal 2008; 22: 2198-2205.

Germann T; Hess H; Szeliga J Rude E. Characterization of the adjuvant effect of IL-12 and efficacy of IL-12 inhibitors in type II collagen-induced arthritis. Ann N Y Acad Sci 1996; 795: 227-240.

Gran B; Zhang GX; Yu S; Chen XH; Ventura ES; Kamoun M; Rostami A. IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. J Immunol 2002; 169: 7104-7110.

Henkin CS; Coelho JC; Paganella MC; Siqueira RM; Dias FS. Sepse: Uma visão atual. Scientia Medica, Porto Alegre, 2009; 19, 3: 135-145.

Hotchkiss RS; Tinsley KW; Swanson PE; Schmieg RE; Jr., Hui JJ; Chang KC; Osborne DF; Freeman BD; Cobb JP; Buchman TG; Karl IE. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. J Immunol 2001; 166: 6952-6963.

Hotchkiss RS; Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med 2003; 348: 138-150.

Hotchkiss RS; Opal S. Immunotherapy for sepsis – A new approach against an ancient foe. N Engl J Med 2010; 363 (1): 87-89.

Ivanov II; McKenzie BS; Zhou L; Tadokoro CE; Lepelley A; Lafaille JJ; Cua DJ; Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR gamma t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. Cell 2006; 126: 1121-1133.

Jones LS; Rizzo LV; Agarwal RK; Tarrant TK; Chan CC; Wiggert B; Caspi RR. IFN-gamma deficient mice develop experimental autoimmune uveitis in the context of a deviant effector response. J. Immunol. 1997; 158: 5997-6005.

Kinasewitz GT; Yan SB; Basson B; Comp P; Russell JA; Cariou A; *et al*. Universal changes in biomarkers of coagulation and inflammation occur in patients with severe sepsis, regardless of causative micro-organism [ISRCTN74215569]. Crit Care 2004; 8: 82-90.

Koga C; Kabashima K; Shiraishi N; Kobayashi M; Tokura Y. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. J Invest Dermatol 2008; 128: 2625-2630.

Kolls JK; Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. Immunity 2004; 21: 467-476.

Korn T; Mitsdoerffer M; Croxford AL; Awasthi A; Dardalhon VA; Galileos G; Vollmar P; Stritesky GL; Kaplan MH; Waisman A; Kuchroo VK; Oukka M. IL-6 controls Th17 immunity *in vivo* by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2008; 105: 18460-18465.

Kotake S; Udagawa N; Takahashi N; Matsuzaki K; Itoh K; Ishiyama S; Saito S: Inoue K; Kamatani N; Gillespie MT; Martin T; Suda T. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. J. Clin. Invest. 1999; 103: 1345-1352.

Langrish CL; Chen Y; Blumenschein WM; Mattson J; Basham B; Sedgwick JD; McClanahan T; Kastelein RA; Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell populationthat induces autoimmune inflammation. J. Exp. Med. 2005; 201: 233-240.

Levy MM; Fink MP; Marshall JC; et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS Intenational Sepsis Definitions Conference. Intensive Care Med 2003; 29: 530-538.

Linde-Zwirble WT; Angus DC. Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society. Crit Care 2004; 8: 222-226.

Lotze MT; Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear wcapon in the immune arsenal. Nat Rev Immunol 2005; 5: 331-342.

Luger D; Silver PB; Tang J; Cua D; Chen Z; Iwakura Y; Bowman EP; Sgambellone NM; Chan CC; Caspi RR. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. J. Exp. Med. 2008; 205: 799-810.

Maina N; Ngotho JM; Were T; Thuita JK; Mwangangi DM; Kagira JM; *et al*. Proinflammatory cytokines expression in the early phase of *Trypanosoma brucei rhodesiense* infection in vervet monkeys (Cercopithecus aethiops). Infect Immun 2004; 72: 3063-3065.

Malaguarnera L; Pignatelli S; Simpore J; Malaguarnera M; Musumeci S. Plasma levels of interleukin-12 (IL-12), interleukin-18 (IL-18) and transforming growth factor beta (TGF-beta) in *Plasmodium falciparum malaria*. Eur Cytokine Netw 2002; 13: 425-430.

Mangan PR; Harrington LE; O'Quinn DB; Helms WS; Bullard DC; Elson CO; Hatton RD; Wahl SM; Schoeb TR; Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. Nature 2006; 441: 231-234.

Matthys P; Vermeire K; Mitera T; Heremans H; Huang S; Billiau A. Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of collagen-induced arthritis in IFN-γ receptor-deficient mice. Eur. J. Immunol. 1998; 28: 2143-2151.

Monneret G; Finck ME; Venet F; Debard AL; Bohe J; Bienvenu J; *et al*. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. Immunol Lett 2004; 95: 193-198.

Mosmann TR; Cherwinski H; Bond MW; Giedlin MA; Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 1986; 136: 2348-2357.

Nurieva, R; Yang XO; Martinez G; Zhang Y; Panopoulos AD; Ma L; Schluns K; Tian Q; Watowich SS; Jetten AM; Dong C. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. Nature 2007; 448: 480–483.

Panitch HS. Interferons in multiple sclerosis. A review of the evidence. Drugs 1992; 44: 946-962.

Ponce de Leon-Rosales SP; Molinar-Ramos F; Dominguez-Cherit G; Rangel-Frausto MS; Vasquez-Ramos VG. Prevalence of infections in intensive care units in Mexico: a multicenter study. Crit Care Med 2000; 28: 1316-1321.

Riedemann NC; Guo RF; Ward PA. The enigma of sepsis. J Clin Invest 2003; 112: 460-467.

Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annu Rev Immunol 2004; 22: 531-562.

Salomão R; Wey SB; Pignatari AC; Castelo Filho A. [Epidemiology of bacteremias at a university hospital]. Rev Assoc Med Bras. 1992; 38 (2): 62-66.

Salomão R; Castelo Filho A; Pignatari AC; Wey SB. Nosocomial and community acquired bacteremia: variables associated with outcomes. Rev Paul Med. 1993; 111 (6): 456-461.

Saoudi A; Kuhn J; Huygen K; de Kozak Y; Velu T; Goldman M; Druet P; Bellon B. Th2 activated cells prevent experimental autoimmune uveoretinitis, a Th1-dependent autoimmune disease. Eur. J. Immunol. 1993; 23: 3096-3103.

Silva E; Pedro MA; Sogayar AC; Mohovic T; Silva CL; Janiszewski M; et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). Crit Care 2004; 8: R251-R60.

Steinhauser ML; Hogaboam CM; Kunkel SL; Lukacs NW; Strieter RM; Standiford TJ. IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. J immunol 1999; 162: 392-399.

Sundararajan V; Macisaac CM; Presneill JJ; Cade JF; Visvanathan K. Epidemiology of sepsis in Victoria, Australia. Crit Care Med 2005; 33: 71-80.

Szabo SJ; Sullivan BM; Peng SL; Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. Annu Rev Immunol 2003; 21: 713-758.

Tarrant TK; Silver PB; Chan CC; Wiggert B; Caspi RR. Endogenous IL-12 is required for induction and expression of experimental autoimmune uveitis. J. Immunol. 1998; 161: 122-127.

van Gestel A; Bakker J; Veraart CP; van Hout BA. Prevalence and incidence of severe sepsis in Dutch intensive care units. Crit Care 2004; 8: R153-R62.

Venet F; Davin F; Guignant C; Larue A; Cazalis MA; Darbon R; Allombert C; Mougin B; Malcus C; Poitevin-Later F; Lepape A; Monneret G. Early Assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. Shock 2010; Publish Ahead of Print; DOI: 10.1097/SHK.0b013e3181dc0977.

Vincent JL. Clinical sepsis and septic shock – definition, diagnosis and management principles. Langenbecks Arch Surg. 2008a; 393: 817-824.

Vincent JL. EPIC II: sepsis around the world. Minerva Anestesiol. 2008b; 74: 293-296.

Watford WT; Moriguchi M; Morinobu A; O'Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptative immune respondes. Cytokine Growth Factor Rev 2003; 14: 361-368.

Weaver CT; Hatton RD; Mangen PR; Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. Annu Rev Immunol 2007; 25: 821-852.

Wenzel RP; Edmond MB. Severe sepsis-national estimates. Crit Care Med 2001; 29: 1472-1474.

Wu HP; Chen CK; Chung K; Tseng JC; Hua CC; Liu YC; Chuang DY; Yang CH. Serial cytokine levels in patients with severe sepsis. Inflammation Research 2009; 58: 385-393.

Yang J; Chu Y; Yang X; Gao D; Zhu L; Yang X; Wan L; Li M. Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. Arthritis & rheumatism 2009; 60 (5): 1472-1483.

Zhu J; Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. Blood 2008; 112: 1557-1569.

Zhu J; Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. Nature 2010; 20: 4-12.

Abstract

10.0 – ABSTRACT

The inflammatory response is modulated during sepsis and up or down regulation of cell activity depends on cells and functions evaluated. IFN-γ and IL-17 are cytokines characteristics of lymphocyte subsets Th1 and Th17, respectively, and play an important role in immune response, linking innate and adaptative immunity. **Objective:** To evaluate the presence of Th1 and Th17 cells in septic patients at admission of the study (D0) compared it with healthy volunteers and after 7 days (D7) follow-up. **Material and Methods:** We included 59 septic patients on D0, of which 31 had samples collected on D7, and 30 healthy individuals. The peripheral blood mononuclear cells were separated and frozen in liquid nitrogen. After thawing and adjust the concentration to $1x10^6$ cells/mL, cells were stimulated or not with PMA/ionomycin for 30 minutes and maintained at 37°C 5% CO_2. Brefeldin A was added and cells were incubated for another 15 hours. Then cells were surface stained for identification of TCD4 lymphocytes (CD3+CD8-). Cells were permeabilized and stained for detection of IL-17A and IFN-γ intracellular. The samples were read in FACSCanto cytometer and analyzed with FlowJo program. **Results:** The basal production of IFN-γ and IL-17A was higher in patients compared to healthy volunteers (*P*=0,002 e *P*<0,001, respectively). After stimulation, the production of IL-17A was higher in patients (*P*=0,027) while the IFN-γ was higher in healthy (*P*=0,001). An increase IFN-γ production after stimulation with PMA/ionomycin was found in patients with septic shock compared to severe sepsis (*P*=0,039). The baseline production of IFN-γ and after PMA/Ionomycin stimulation was found to be increased in D7 in relation to D0 (*P*=0,007 e *P*=0,018, respectively). In contrast, the production of IL-17 after stimulation was higher in D0 compared to D7 (*P*=0,003). In patients who died, the D0 samples showed lower constitutive IFN-γ production compared to D7 (*P*=0,023), but after a stimulus, no difference was found. In patients who survived, there was no difference at baseline and after stimulation with PMA/ionomycin. The IL-17 production, after stimulation, was higher in D0 sample compared to D7 (*P*=0,006) in patients who survived. No difference between D0 and D7 was found in patients who survived. **Conclusion:** The results with higher basal detection of IFN-γ and IL-17 producing cells in septic patients reflect the degree of inflammation characteristic of sepsis. A dichotomy between Th1 and Th17 responses after PMA/ionomycin stimulation was found in septic patients, with increased Th17 population and decreased Th1 compared to healthy individuals. A higher proportion of Th1 in D7 was observed in patients who died; while a decrease of Th17 population was observed in patients who survived, indicating that the persistence or higher Th1 and Th17 responses may be deleterious. These findings suggest regulation of the inflammatory response in sepsis of Th1 and Th17 populations.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo