

SIDNÉIA DA SILVA SOUSA

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS
DE OXIGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO EM MONÓCITOS E
NEUTRÓFILOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE
PACIENTES SÉPTICOS E A SUA CORRELAÇÃO COM
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.

SIDNÉIA DA SILVA SOUSA

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS
DE OXIGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO EM MONÓCITOS E
NEUTRÓFILOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE
PACIENTES SÉPTICOS E A SUA CORRELAÇÃO COM
DESFECHO CLÍNICO

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

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Salomão

São Paulo

2010

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

Este trabalho foi realizado com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do
Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo 2006/ 58744-1.

SIDNÉIA DA SILVA SOUSA

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS
DE OXIGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO EM MONÓCITOS E
NEUTRÓFILOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE
PACIENTES SÉPTICOS E A SUA CORRELAÇÃO COM
DESFECHO CLÍNICO

Presidente da Banca:
Prof. Dr. Reinaldo Salomão

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Prof. Dr. Prof. Dr. Jamil Assreuy
Prof. Dr. Luciano César Pontes de Azevedo
Dra. Milena Karina Coló Brunialti

SUPLENTE

Prof. Dr. Miguel Cendoroglo Neto

Dedicatória

*A Deus por tornar todas as coisas possíveis, a meus pais, Eunice e
Manoel pelo amor incondicional, a minha irmã Elaine pela
amizade, a meu amado João por seu amor, a minha família pela força
e a meus amigos pelo carinho.*

Agradecimentos

A Deus pela interminável força,

A Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) pelos conhecimentos adquiridos,

Ao Prof. Dr. Reinaldo Salomão, pela orientação, confiança e amizade, que contribuíram para minha formação com exemplos sólidos de ética e responsabilidade e por me proporcionar desafios que me fizeram crescer profissionalmente,

A querida Dra. Milena Karina Coló Brunialti, pela amizade, paciência e pelos ensinamentos pedagógicos e científicos imensuráveis durante a realização deste trabalho,

A Dra. Giovana Lotici Baggio Zappia pela amizade, paciência e orientações estatísticas,

Ao meu amado João por existir em minha vida, por seu apoio, incentivo, companheirismo, compreensão e paciência,

A toda minha família pelos sólidos ensinamentos, sincero apoio e incentivo sempre,

A minha amiga-irmã Solange Maia de Souza pelos momentos de risos e pela paciência de me ouvir e me aconselhar.

A minha amiga Maria da Luz Fernandes, por este coração enorme capaz de abraçar o mundo e pela disponibilidade de atender a tantas necessidades.

A minha querida Antônia Alves da Cunha pelo seu carinho mesmo na hora de pedir resultados de CD4.

A Maria de Jesus por realizar um importante trabalho, sem o qual tornaria difícil a realização dos nossos experimentos.

Aos colegas do laboratório de Imunologia Selma, Amanda, Marialice, Marjorie, Ramon, Thatiana, Regina, Michelle, Leandro, Vanessa e a todo lado B (Laboratório de Virologia) pelos momentos de descontração e divertimento,

Aos pacientes sépticos e seus parentes bem como todos os voluntários sadios por permitirem a realização deste estudo e por contribuírem para a evolução da ciência,

Que Deus abençoe a todos!

“As pessoas que vencem neste mundo são aquelas que procuram as oportunidades que precisam e quando não as encontram, as criam...”

Autor desconhecido

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
Listas	xi
Resumo	xvii
1. Introdução.....	1
1.1. Sepses.....	2
1.2. Espécies reativas de oxigênio.....	5
1.3. Óxido nítrico.....	8
1.4. ESPÉCIES reativas de oxigênio e óxido nítrico na sepsis.....	10
2. Objetivos.....	14
3. Materiais e Métodos.....	16
3.1. Reagentes.....	17
3.2. Casuística.....	18
3.2.1. Aspectos éticos e tamanho de amostra.....	18
3.2.2. Critérios de Inclusão.....	19
3.2.3. Critérios de exclusão.....	19
3.3. Cultivo de bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	20
3.4. Ensaio de metabolismo oxidativo de monócitos e neutrófilos por citometria de fluxo.....	21
3.5. Estimulação in vitro de sangue total para estudo da produção de óxido nítrico.....	22
3.6. Aquisição e análise de dados para detecção da produção de NO e EROs.....	24
3.7. Análises estatísticas.....	26
4. Resultados.....	27
4.1. Perfil geral da coorte.....	28
4.2. Produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos e neutrófilos do sangue periférico.....	29
4.2.1. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes na coleta D0 em relação a indivíduos saudáveis.....	30
4.2.2. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes em sepsis grave e choque séptico na coleta D0.....	32
4.2.3. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos na coleta do D0 em relação ao desfecho clínico (sobrevivida ou óbito) na alta hospitalar.....	34
4.2.4. Correlação da produção de espécies reativas de oxigênio em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos com idade, gênero, SOFA e APACHE II na coleta D0.....	36
4.2.5. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes na coleta D0 e D7.....	37
4.2.6. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes	

na admissão e após 7 dias de seguimento em relação ao desfecho clínico (sobrevida ou óbito) na alta hospitalar...	39
4.3. Análise da produção de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico.....	41
4.3.1. Análise da produção de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes na coleta D0 em relação a indivíduos saudáveis.....	42
4.3.2. Análise da produção de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes em sepse grave e choque séptico na coleta D0.....	44
4.3.3. Análise da produção de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos na coleta do D0 em relação ao desfecho clínico (sobrevida ou óbito) na alta hospitalar.....	46
4.3.4. Correlação da produção de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos com idade, gênero SOFA e APACHE II na coleta D0.....	48
4.3.5. Análise da produção de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes na coleta D0 e D7.....	49
4.3.6. Análise da produção de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes na admissão e após 7 dias de seguimento em relação ao desfecho clínico (sobrevida ou óbito) na alta hospitalar.....	51
5. Discussão.....	54
6. Conclusões	60
7. Anexos.....	61
Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido(TCLE).....	62
Anexo 2 – Aprovação do comitê de ética em pesquisa.....	67
8. Bibliografia	68
9. Abstract	73

Lista de figuras

Figura 1.	Figura representativa da formação de ânion superóxido (O ₂) a partir de oxigênio em reação catalisada pela NADPH oxidase.....	08
Figura 2.	Biossíntese da formação do óxido nítrico a partir da L-arginina pela ativação da enzima óxido nítrico sintase.....	10
Figura 3.	Esquema representativo da reação do DCFH-DA.....	21
Figura 4.	Reação esquemática para detecção de óxido nítrico por DAF-FM diacetado.....	23
Figura 5.	Estratégia de aquisição e análise da produção de EROs e NO em sangue total.....	25
Figura 6.	Estratégia de análise para detecção de EROs (A) e NO (B) em sangue total.....	26
Figura 7.	Metabolismo oxidativo de monócitos de 48 pacientes (D0) e 19 indivíduos saudáveis.....	30
Figura 8.	Metabolismo oxidativo de neutrófilos de 49 pacientes (D0) e 19 indivíduos saudáveis.....	31
Figura 9.	Metabolismo oxidativo de monócitos de 14 pacientes com sepse grave e 33 pacientes com choque séptico na coleta do dia 0.....	32
Figura 10.	Metabolismo oxidativo de neutrófilos de 14 pacientes com sepse grave e 34 pacientes com choque séptico na coleta do dia 0.....	33
Figura 11.	Metabolismo oxidativo em monócitos de 47 pacientes no dia 0 em relação a mortalidade (alta hospitalar).....	34
Figura 12.	Metabolismo oxidativo em neutrófilos de 48 pacientes no dia 0 em relação a mortalidade (alta hospitalar).....	35
Figura 13.	Metabolismo oxidativo em monócitos de 28 pacientes sépticos no D0 e D7.....	37
Figura 14.	Metabolismo oxidativo em neutrófilos de 30 pacientes sépticos nas coletas do D0 e D7.....	38
Figura 15.	Metabolismo oxidativo em monócitos de 27 pacientes sépticos no seguimento (D0 e D7) em relação a mortalidade (alta hospitalar).....	39
Figura 16.	Metabolismo oxidativo em neutrófilos de 29 pacientes sépticos no seguimento (D0 e D7) em relação a mortalidade(alta hospitalar).....	40
Figura 17.	Produção de óxido nítrico em monócitos de 48 pacientes (D0) e 19 indivíduos saudáveis.....	42
Figura 18.	Produção de óxido nítrico em neutrófilos de 49 pacientes (D0) e 19 indivíduos saudáveis.....	43
Figura 19.	Produção de óxido nítrico em monócitos de 13 pacientes com sepse grave e 33 pacientes com choque séptico na coleta do dia 0.....	44
Figura 20.	Produção de óxido nítrico em neutrófilos de 13 pacientes com sepse grave e 34 pacientes com choque séptico na coleta do dia 0.....	45

Figura 21.	Produção de óxido nítrico em monócitos de 46 pacientes no dia 0 em relação a mortalidade (alta hospitalar).....	46
Figura 22.	Produção de óxido nítrico em neutrófilos de 47 pacientes no dia 0 em relação a mortalidade (alta hospitalar).....	47
Figura 23.	Produção de óxido nítrico em monócitos de 28 pacientes sépticos no D0 e D7.....	49
Figura 24.	Produção de óxido nítrico em neutrófilos de 29 pacientes sépticos nas coletas do D0 e D7.....	50
Figura 25.	Produção de óxido nítrico em monócitos de 27 pacientes sépticos no seguimento (D0 e D7) em relação a mortalidade (alta hospitalar).....	51
Figura 26.	Produção de óxido nítrico em neutrófilos de 28 pacientes sépticos no seguimento (D0 e D7) em relação a mortalidade (alta hospitalar).....	52

Lista de tabelas

Tabela 1	Número de amostras obtidas para mensuração de metabolismo oxidativo em monócitos e neutrófilos do sangue periférico.....	18
Tabela 2	Número de amostras obtidas para mensuração de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico.....	18
Tabela 3	Estímulos utilizados no ensaio de metabolismo oxidativo de neutrófilos e monócitos por citometria de fluxo.....	22
Tabela 4	utilizados no ensaio de óxido nítrico de monócitos e neutrófilos por citometria de fluxo.....	23
Tabela 5	Características principais da coorte incluída no estudo	28
Tabela 6	Metabolismo oxidativo em monócitos do sangue periférico de indivíduos sadios e pacientes sépticos no dia 0.....	30
Tabela 7	Metabolismo oxidativo em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos sadios e pacientes sépticos no dia 0.....	31
Tabela 8	Metabolismo oxidativo em monócitos do sangue periférico de pacientes com sepse grave e choque séptico no dia 0.....	32
Tabela 9	Metabolismo oxidativo em neutrófilos do sangue periférico de pacientes com sepse grave e choque séptico no dia 0.....	33
Tabela 10	Metabolismo oxidativo em monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos no D0 em relação a mortalidade (alta hospitalar).....	34
Tabela 11	Metabolismo oxidativo de neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos no D0 em relação a mortalidade (alta hospitalar).....	35
Tabela 12	Correlação do metabolismo oxidativo com idade, gênero, SOFA e APACHE II em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de 49 pacientes no dia 0.....	36
Tabela 13	Metabolismo oxidativo em monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos no D0 e D7.....	37
Tabela 14	oxidativo em neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos no D0 e D7.....	38
Tabela 15	Metabolismo oxidativo em monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos no seguimento (D0 e D7) em relação a mortalidade (alta hospitalar).....	39
Tabela 16	Metabolismo oxidativo em neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos no seguimento (D0 e D7) em relação a mortalidade (alta hospitalar).....	40
Tabela 17	Produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de indivíduos sadios e pacientes sépticos no dia 0.....	42
Tabela 18	Produção de óxido nítrico em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos sadios e pacientes sépticos no dia 0.....	43
Tabela 19	Produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de pacientes com sepse grave e choque séptico no dia 0.	44
Tabela 20	Produção de óxido nítrico em neutrófilos do sangue periférico de pacientes com sepse grave e choque septico no dia	

	0.....	45
Tabela 21	Produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos no D0 em relação a mortalidade (alta hospitalar).....	46
Tabela 22	Produção de óxido nítrico em neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos no D0 em relação a mortalidade (alta hospitalar).....	47
Tabela 23	Correlação da produção de óxido nítrico com idade, gênero, SOFA e APACHE II em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de 49 pacientes no dia 0.....	48
Tabela 24	Produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos no D0 e D7.....	49
Tabela 25	Produção de óxido nítrico em neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos no D0 e D7.....	50
Tabela 26	Produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos no seguimento (D0 e D7) em relação a mortalidade (alta hospitalar).....	51
Tabela 27	Produção de óxido nítrico em neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos no seguimento (D0 e D7) em relação a mortalidade (alta hospitalar).....	52

Lista de abreviaturas

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
APACHE II	<i>Acute Physiology And Chronic Health Evaluation</i>
BASES	<i>Brazilian Sepsis Epidemiological Study</i>
BD	Becton & Dickinson
BH4	tetrahidrobiopterina
°C	graus Celsius
Ca ⁺⁺	cálcio
CD	“cluster of differentiation”
CLP	modelo de ligação cecal e perfuração
c-NOS	óxido nítrico sintase constitutiva
CO ₂	dióxido de carbono
D0	dia 0
D7	dia 7
DAF-FM DA	4-amino-5-metilamino- 2',7'-difluorofluoresceína diacetato
DCF	diclorofluoresceína
DCFH	2'7'-diclorofluorceína diacetato
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
e-NOS	óxido nítrico sintase endotelial
EROs	espécies reativas de oxigênio
FAD	flavina adenina dinucleotídio
FITC	fluoresceína isotiocianato
FMN	flavina mononucleotídio
g	grama
g	Força gravitacional (velocidade de centrifugação)
H	hidrogênio
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HUVEC	células <i>naïve</i> de cordão umbilical
IL-1β	interleucina-1beta
i-NOS	óxido nítrico sintase induzível
L-NMMA	N ^w -monomethyl-L-arginine
LPS	lipopolissacarídeo
MGFI	média geométrica da intensidade de fluorescência
mm ³	milímetro cúbico
mmHg	milímetro de mercúrio
MPO	mieloperoxidase
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotideo phosphatase
NF-κB	fator nuclear-kappa B
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
O ₂	oxigênio
O ₂ ⁻	ânion superóxido

OH [·]	radical hidroxila
ONOO ⁻	peroxinitrito
PaCO ₂	pressão parcial de CO ₂
PAF	fator ativador de plaquetas
PBS	solução tampão fosfatada
PerCP	clorofila peridinina
SOD	superóxido dismutase
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TLR	<i>"Toll-Like Receptor"</i>
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
TSB	<i>tryptic soy broth</i>
UTI	unidade de terapia intensiva

Resumo

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra infecções. A erradicação de microorganismos invasores pelos neutrófilos, monócitos e macrófagos depende em grande parte da capacidade fagocítica e posterior geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), assim como produção de óxido nítrico (NO). Neste trabalho avaliou-se a produção de EROs e NO em monócitos e neutrófilos do sangue periférico, em um mesmo indivíduo durante o tratamento da sepse. **Casuística e métodos:** Foi coletado sangue em heparina sódica de 50 pacientes sépticos nos dias zero (D0), até 48h após o evento sepse. Foi realizada uma segunda coleta em 30 destes pacientes sete dias (D7) após a primeira. A produção de EROs e de NO foi mensurada por citometria de fluxo, utilizando-se como substrato DCFH-DA e DAF-FM-DA, respectivamente. Os dados foram adquiridos e analisados no programa CellQuest. Nos ensaios foi observada a produção espontânea e após os estímulos com *S. aureus* e *P. aeruginosa*. **Resultados:** A produção de EROs no dia 0 em monócitos e neutrófilos foi maior nos pacientes sépticos comparado aos controles sadios nas três situações avaliadas: sem estímulo, estimulado com *P.aeruginosa* e *S. aureus*. A produção EROs em monócitos e neutrófilos no D0 não apresentou correlação com idade, gênero e os escores APACHE II e SOFA. Não houve diferença na produção de EROs e NO entre pacientes com sepse grave e choque séptico. Também não houve diferença na produção de EROs entre pacientes que sobreviveram e que evoluíram para óbito no D0. Os monócitos dos pacientes apresentaram diminuição da produção de EROs no dia 7 em relação ao dia 0 em todas as situações analisadas, enquanto essa diminuição nos neutrófilos ocorreu somente na situação estimulada com *S. aureus*. Nas coletas de seguimento em relação ao desfecho clínico dos pacientes na alta hospitalar (mortalidade ou sobrevida), os monócitos dos pacientes que sobreviveram apresentaram diminuição da produção de EROs no dia 7 em relação ao dia 0 em todas as situações avaliadas. Nos neutrófilos essa diminuição ocorreu nas situações estimuladas com *P. aeruginosa* e *S. aureus*. A produção de NO em monócitos no dia 0 foi maior nos pacientes sépticos comparado aos controles sadios nas três situações avaliadas: sem estímulo, estimulado com *P. aeruginosa* e *S.aureus* enquanto que nos neutrófilos isso ocorreu somente na situação sem estímulo. A produção de No em monócitos e neutrófilos no D0 não apresentou correlação com idade, gênero e os scores APACHE II e SOFA. Não houve diferença na produção de NO entre pacientes com sepse grave e choque séptico. Também não houve diferença na produção de NO entre pacientes que sobreviveram e que evoluíram para óbito no D0. A produção de NO nos monócitos mostrou-se aumentada no D0 comparado ao D7 na situação sem estímulo. Nos neutrófilos isso ocorreu nas condições sem estímulo e estimulado com *S. aureus*. Nas coletas de seguimento em relação ao desfecho clínico dos pacientes na alta hospitalar (mortalidade ou sobrevida), os monócitos e neutrófilos dos pacientes que sobreviveram apresentaram uma diminuição de NO no dia 7 em relação ao dia 0 nas situações sem estímulo e estimulado com *S. aureus*. **Conclusão:** O aumento da produção de EROs e NO no início da sepse contribui para uma resposta eficaz do hospedeiro para erradicação do patógeno do organismo, mas a persistência exacerbada desses mediadores pode ter impacto negativo na sobrevida do paciente com sepse.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. SEPSE

Sepse resulta de uma resposta complexa do hospedeiro à agressão de um patógeno. Infecções por bactérias gram-positivas e gram-negativas são as maiores causas de sepse, que é caracterizada pela extensão da infecção local para o nível sistêmico. Resultante de uma interação entre microorganismo infectante e a resposta imune, pró e antiinflamatória e pró-coagulante do indivíduo é uma das doenças mais desafiadoras da medicina (Spiller *et al.*, 2008; Henkin *et al.*, 2009).

No início da década de 90 o consenso das Sociedades de Terapia Intensiva e de Pneumologistas (*American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care*), definiu sepse como uma resposta sistêmica à infecção manifestada pela presença de dois ou mais dos sintomas: a) alteração de temperatura, acima de 38°C ou abaixo de 36°C; b) aumento de frequência cardíaca, acima de 90 batimentos por minuto; c) aumento de frequência respiratória, acima de 20 respirações por minuto ou PaCO₂ menor que 32 mmHg; d) contagem de leucócitos no sangue acima de 12000/mm³ ou menor que 4000/mm³ ou mais do que 10% de neutrófilos imaturos. A sepse pode apresentar-se de maneiras mais graves podendo ser caracterizada por sepse grave quando ocorre juntamente com a presença de pelo menos uma disfunção orgânica e como choque séptico quando há hipotensão refratária à adequada administração de fluido com hipoperfusão (Bone *et al.*, 1992; Remick, 2007).

A sepse foi apontada como principal causa de morte em unidades de terapia intensiva (UTIs) não coronariana na Europa (Henkin *et al.*, 2009). Um

recente estudo estimou que a incidência de sepse nos Estados Unidos era de 751.000.00 casos resultando em 215.000.00 mortes em 1995, número equivalente a mortalidade por infarto agudo do miocárdio. Este mesmo estudo demonstrou que a mortalidade na sepse pode aumentar devido à idade, pois pacientes com mais de 85 anos apresentaram uma mortalidade de 38%, enquanto que a mortalidade em crianças foi de 10%. O custo médio por caso de sepse foi de US\$ 22.100.00 com custo total de US\$ 16,7 bilhões nacionalmente (Remick, 2007).

No Brasil estudo realizado em cinco UTIs do estado de São Paulo e Santa Catarina BASES (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*), (Silva *et al.*, 2004) mostrou que a incidência de sepse foi 46,9%, sepse grave 27,3% e choque séptico 23%. A mortalidade nestes pacientes foi 33,9%, 46,9% e 52,2%, respectivamente. Ainda no Brasil um estudo observacional multicêntrico realizado em 21 UTIs de hospitais públicos e privados, no período de outubro de 2003 a março de 2004, estimou uma média de custo de US\$ 9.632 por internação, com uma média de custo de US\$ 934 por paciente/dia (Sogayar *et al.*, 2008). Estes estudos demonstram que a sepse é internacionalmente comum, com altas taxas de mortalidade e enormes custos sociais e econômicos o que nos leva a considerá-la um importante problema de saúde pública.

Houve grande progresso na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da sepse nos últimos anos, especialmente em relação ao reconhecimento e sinalização celular induzida por produtos bacterianos. Todavia, intervenções terapêuticas baseadas nos mecanismos de doença ainda geram resultados conflitantes (Rigato, Silva & Salomão, 2006).

A patogênese da sepse envolve uma complexa interação entre o hospedeiro e o microorganismo infectante, incluindo reconhecimento bacteriano, ativação celular e transmigração, fagocitose e morte do patógeno. O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra infecções e compreende as funções de reconhecimento ou de sensibilização e a função efetora. Dentre as células efetoras do sistema imune inato, as mais importantes são os neutrófilos e macrófagos, capazes de fagocitar e digerir os patógenos, secretar citocinas e quimiocinas, além de coordenar mecanismos adicionais de resposta do hospedeiro (Hoebe, Janssen & Beutler 2004; Martins *et al.*, 2008).

Esta complexa resposta é mediada pelos receptores de reconhecimento padrão, como os receptores *Toll-like* (TLRs) e o CD14, que reconhecem os patógenos ou seus produtos, identificados como PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos). Os TLR-2 reconhecem os peptidoglicanos das bactérias Gram-positivas, enquanto os lipopolissacarídeos (LPS) das Gram-negativas são reconhecidos pelos TLR-4. Após a sua ativação, os TLRs desencadeiam uma cascata de eventos intracelulares que culminam na expressão gênica de moléculas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-1beta (IL-1 β) e também citocinas anti-inflamatórias como interleucina-10 (Akira & Takeda, 2004; Henkin *et al.*, 2009).

A produção de citocinas pro-inflamatórias no local da infecção aumenta a expressão de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais, agindo assim no recrutamento destas células para mediar às defesas locais do hospedeiro. Por outro lado, altos níveis de citocina podem ser deletérios para o indivíduo. A presença de citocinas na circulação estimula a produção de outros mediadores inflamatórios como metabólitos do ácido araquidônico

(prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaquetas - PAF), produtos derivados do complemento, mediadores vasoativos (bradicinina e angiotensina), espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO). A perda do equilíbrio na produção desses mediadores pode levar a uma amplificação da resposta inflamatória criando um ambiente favorável a falência de múltiplos órgãos culminando com um aumento na morbidez e mortalidade dos indivíduos (Benjamin *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2006; Henkin *et al.*, 2009; Levi & van der Poll, 2010).

1.2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Durante a sepse, células inflamatórias como monócitos e neutrófilos produzem grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio. Essas espécies são tóxicas e contribuem em parte para a defesa do hospedeiro destruindo microrganismos invasores. Essa erradicação pelos monócitos e neutrófilos é dependente da capacidade fagocítica e posterior geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a explosão respiratória. O rompimento do equilíbrio entre geração de EROs e as defesas antioxidantes resulta no estresse oxidativo, o qual está associado a algumas condições patológicas. (Segal, 2005; Huet *et al.*, 2007).

De extrema importância para os organismos aeróbicos o oxigênio (O₂) é utilizado como aceptor de elétrons, porque permite elevada produção de energia na respiração, em consequência de seu alto potencial eletroquímico. Devido a sua configuração eletrônica, o O₂ pode sofrer reduções parciais e levar à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), terminologia que inclui as espécies radicais livres e outras que, embora não possuam elétrons

desemparelhados, são muito reativas em decorrência de sua instabilidade (Ribeiro *et al.*, 2005).

Do total de oxigênio consumido na cadeia respiratória, 95 a 98% é utilizado como acceptor final de elétrons pelas células animais, sendo totalmente reduzido com formação de água. Entretanto, cerca de 2 a 5% do oxigênio é gerado como um intermediário reduzido univalentemente formando o radical superóxido (Magder, 2006; Orrenius, 2007). O radical superóxido, a primeira das espécies formadas pela redução do oxigênio por um único elétron, pode agir como oxidante ou como redutor dando origem as EROs moléculas altamente reativas e extremamente tóxicas, (Ribeiro *et al.*, 2005) produzidas no interior dos fagossomos por uma série de reações iniciadas pela NADPH (nicotinamida adenina dinucleotideo phosphatase) oxidase um grupo de enzimas que é encontrada em fagócitos profissionais e linfócitos B (Babior, 1999).

Uma vez fagocitados, os microorganismos ficam expostos a agentes bactericidas resultantes, em parte, dos produtos liberados pela degranulação dos neutrófilos e em grande parte das EROs. A ativação do metabolismo oxidativo como dito anteriormente, envolve a NADPH oxidase, um complexo enzimático formado por quatro subunidades separadas - a p40, a p47 e a p67 que fazem parte do citosol, e o complexo protéico de membrana p22 - p91, também conhecido como citocromo b558 (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). A NADPH oxidase pode ser ativada por diversas substâncias, como, por exemplo, o LPS presente na parede das bactérias Gram-negativas.

Uma vez que os neutrófilos estão ativados, são capazes de produzirem ânion superóxido (O_2^-) a partir da forma molecular comum do oxigênio (O_2), em

uma reação catalisada pela NADPH oxidase. Assim temos: $2O_2 + NADPH \rightarrow 2O_2^- + NADP + H^+$. O ânion superóxido por si só não é um agente oxidante, porém como dito anteriormente, funciona como substrato na produção de EROs. Na presença da enzima superóxido dismutase (SOD) o O_2^- pode ser convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é um substrato abundante na geração de agentes oxidantes mais poderosos. Esta é a principal reação que permite a geração subsequente de EROs: $2H^+ + 2O_2^- = H_2O_2 + O_2$. Dentre os produtos que são gerados a partir de H_2O_2 encontram-se compostos ácidos, incluindo o ácido hipocloroso, cuja formação depende da ação da mieloperoxidase (MPO): $Cl^- + H_2O_2 + H^+ = HOCl + H_2O$. Estes compostos são microbicidas muito potentes com papel central no arsenal de fagócitos, atuando diretamente na morte de micróbios e na formação de outros metabólitos como o radical hidroxila (OH^\bullet). Deve-se lembrar que a hidroxila também pode ser produzida independentemente de H_2O_2 e O_2^- via reação de Fenton: $Fe^{2+} + H_2O_2 = Fe^{3+} + OH^\bullet + OH^-$. (Babior, 1984; Vlessis, Goldman & Trunkey, 1995; Beutler, 2004).

Levando-se em consideração o potencial das EROs no meio biológico o radical hidroxil é o mais reativo, pois em teoria pode oxidar qualquer molécula biológica reagindo nas proximidades dos sítios onde foi gerado. O peróxido de hidrogênio, mais estável pode permear membranas possibilitando reações com alvos biológicos distantes do seu local de formação (Ribeiro *et al.*, 2005).

A figura 1 mostra a formação de ânion superóxido a partir de oxigênio e da NADPH e as moléculas com potencial microbicida com suas respectivas vias e enzimas catalisadoras (Beutler, 2004).

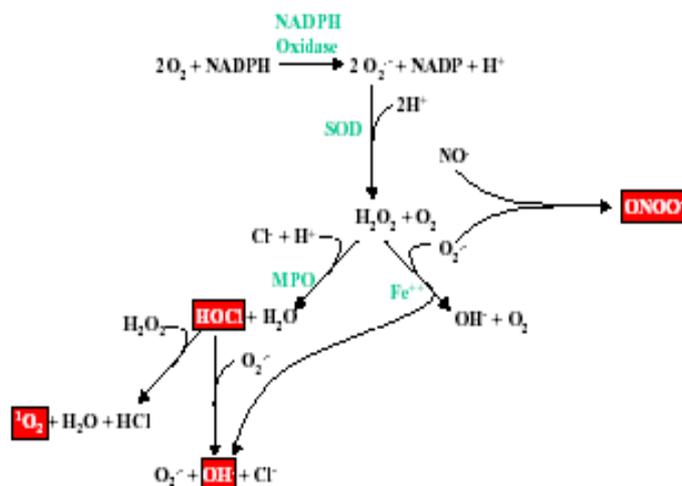


Figura 1: Figura representativa da formação de ânion superóxido (O_2^-) a partir de oxigênio em reação catalisada pela NADPH oxidase. A partir daí, ocorre formação das espécies reativas de oxigênio; peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito (ONOO^-). SOD: enzima superóxido dismutase. MOP: mieloperoxidase.

1.3. ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado. Essa pequena e simples molécula, talvez a menor produzida pelos mamíferos, está presente na inflamação atuando na resposta imune, vasodilatação, neurotransmissão, proliferação e apoptose (Filho, Zilberstein, 2000; Dusse, Vieira & Carvalho das Graças, 2003).

O NO é produzido enzimaticamente por três diferentes NO sintases agrupadas em duas categorias: a NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio (Ca^{++}) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas. A isoforma constitutiva compreende a NOS neuronal (n-NOS),

presente normalmente nos neurônios e a NOS endotelial (e-NOS), presente normalmente nas células endoteliais vasculares. A ativação da c-NOS depende da interação com a calmodulina, que por sua vez, é controlada pelos níveis de Ca^{++} e produz pequenas quantidades de NO. A i-NOS não é expressa sob condições normais, é induzida por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, incluindo-se macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condriócitos, neutrófilos e plaquetas. Não é dependente de cálcio e uma vez ativada produz quantidades maiores de NO que podem ser sustentadas por vários dias (Geller & Billiar, 1998; Andrew & Mayer, 1999).

O NO é produzido através da conversão da L-arginina em um intermediário, a N^G -hidroxi-L-arginina com a presença de nicotinamida-adeninaducleotídeo fosfato-hidrogênio (NADPH) e Ca^{2+} sendo necessário mais NADPH e O_2 para a formação de L-citrulina e NO (figura 2). Co-fatores como o tetrahydrobiopterina (BH4), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) flavina mononucleotídeo (FMN) e heme são requeridos para que ocorra essa reação. Em certas condições, NOS pode formar superóxido ao invés de NO. A geração de superóxido mediada pela NOS ocorre quando há diminuição nas concentrações do substrato arginina e do co-fator BH4. Espécies reativas de nitrogênio como o peroxinitrito, também são produzidas por meio de reação espontânea tendo O_2^- como substrato: $NO + O_2^- = ONOO^-$, um potente oxidante que pode oxidar/nitrar outras moléculas (Govers e Rabelink, 2001; Andrew & Mayer, 1999).

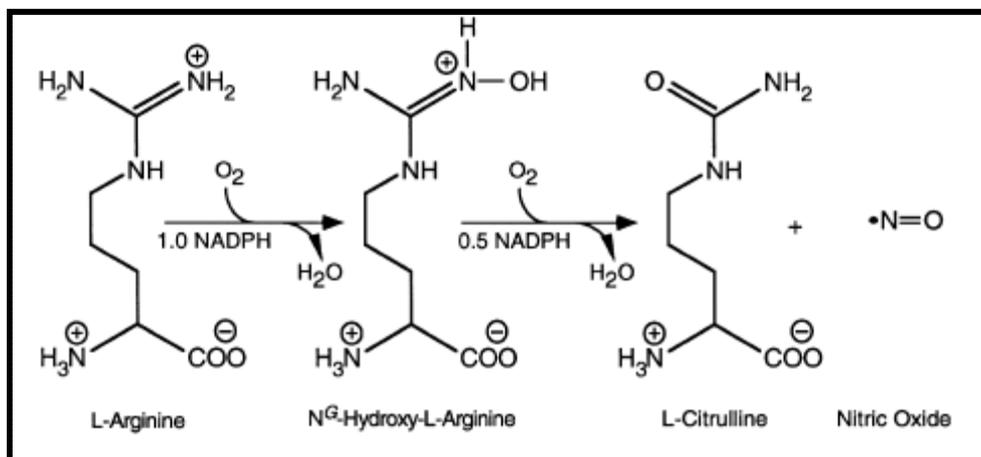


Figura 2: Biossíntese da formação do óxido nítrico a partir da L-arginina pela ativação da enzima óxido nítrico sintase na presença de NADPH tendo como produtos finais L-citrulina e NO. Adaptado de Andrew & Mayer, 1999.

1.4. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO NA SEPSE

Sepse representa uma intensa resposta inflamatória com alterações na resposta imunológica que geralmente são causadas por infecção bacteriana. Neste contexto monócitos e neutrófilos respondem a essa invasão produzindo grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que contribuem para erradicação do patógeno. Paradoxalmente, muitas das alterações fisiopatológicas observadas na sepse são desencadeadas pela modulação da resposta, pois a produção excessiva desses mediadores pode levar a disfunção e falência de órgãos. Estímulos como LPS e TNF- α podem ativar fatores de transcrição como NF- κ B resultando em ativação da transcrição de múltiplos genes. Isso conduz a liberação de citocinas, aumento de moléculas de adesão e quimiocinas. A produção de EROs e NO podem ser

relatadas como alguns dos efeitos danosos da produção de citocinas durante a sepse (Benjamim *et al.*, 2002; Cepinskas & Wilson, 2008).

Aumento do metabolismo oxidativo de neutrófilos basal e frente a estímulos diversos em pacientes com sepse grave e choque séptico comparados a indivíduos saudáveis, tem sido demonstrado em trabalhos anteriores de nosso grupo (Martins *et al.* 2003). Estudo realizado na França em 2007 demonstrou a capacidade do plasma de pacientes com choque séptico em induzir a formação de EROs em células *naïve* de cordão umbilical (HUVEC) e que esta produção estava correlacionada com critérios de gravidade e mortalidade, como escore de SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) (Huet *et al.*, 2007).

Estudo recente de nosso grupo demonstrou o aumento de metabolismo oxidativo em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de pacientes com sepse comparado a saudáveis na condição basal e frente a diversos estímulos. Também foi observado que pacientes com sepse grave e choque séptico com $SOFA \geq 7$ (SOFA de discriminação entre sobreviventes e não sobreviventes/mortalidade 28 dias) apresentaram maior produção de metabolismo oxidativo. Houve forte correlação entre produção de EROs em monócitos e neutrófilos destes pacientes. Este estudo demonstrou a importância da produção de EROs nos altos índices de mortalidade de pacientes com sepse (Martins, *et al.*, 2008).

A produção de óxido nítrico também tem sido relatada como fator influenciador de mortalidade na sepse. Não há nenhuma dúvida sobre o efeito prejudicial de NO, quando em excesso, na vasodilatação, hipotensão e choque. Os mediadores de óxido nítrico sintase (NOS) conduzem a hipóxia grave nos

órgãos periféricos centrais, resultando em falência progressiva de órgãos. A NOS também pode contribuir diretamente para o dano no tecido de órgãos por seu efeito citotóxico direto mediado pelo peroxinitrito. Por outro lado, o NO pode apresentar efeitos protetores nos órgãos pela sua capacidade de prevenir o estresse oxidativo, diminuir a apoptose, prevenir a agregação de plaquetas e adesão de leucócitos, induzir a expressão de genes antiinflamatórios, e matar os patógenos (Cauwels, 2007; Hollenberg, Guglielmi & Parrillo, 2007).

A detecção de NO em amostras biológicas representa um desafio, em função da ínfima concentração e da meia-vida extremamente curta deste composto. Sendo assim a maioria dos estudos utiliza-se da produção dos seus metabólitos como nitrito e nitrato, detecção ou inibição das NO sintases para estimarem sua produção e efeitos. Entretanto, o valor de estratégias terapêuticas como bloqueio das NO sintases e administração de doadores de óxido nítrico é ainda controversa (Baumgart, Radermacher & Wagner, 2009). A administração de aminoguanidina, um inibidor de NO sintase preveniu a falência de migração dos neutrófilos e protegeu camundongos submetidos à CLP (modelo de ligação cecal e perfuração), enquanto camundongos deficientes de NO sintase não apresentaram falência de migração, mas obtiveram 100% de letalidade e altas concentrações de bactérias no exudato. Demonstrou-se assim, que os neutrófilos destes camundongos preservavam sua capacidade de migração, mas não tinham atividade microbicida pela falta de produção de NO (Benjamim *et al.*, 2002). Estudo realizado por Ochoa e colaboradores mostrou que o aumento de nitrito e nitrato no plasma de pacientes com sepse estava relacionado à baixa resistência vascular e que mudanças nos níveis desses metabólitos poderiam mediar a vasodilatação

ocorrida na sepse (Ochoa *et al.*, 1991). Vários estudos tem relatado que a inibição seletiva de NOS previne vasodilatação e hipotensão em modelos experimentais. Em estudo de fase III, randomizado, multicêntrico, duplo-cego, placebo controlado, que avaliou pacientes com choque séptico tratados com antagonista competitivo de óxido nítrico N^w-monomethyl-L-arginine (L-NMMA), ou seja, inibição não seletiva de NOS, embora produzissem efeitos positivos na pressão sanguínea e resistência vascular, estava relacionada com aumento da mortalidade (López *et al.*, 2004).

As observações de associação de produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico com desfecho clínico, observadas na literatura até o momento, embora muito relevantes, baseiam-se em estudo de corte e não de seguimento de um mesmo indivíduo em diferentes estádios da sepse. Além disso, ainda não foi relatada a mensuração de óxido nítrico de forma direta nas células produtoras durante o evento da sepse.

No presente estudo propomos avaliar a produção de EROs e NO logo após as primeiras manifestações clínicas da sepse, e após 7 dias de tratamento e comparar os resultados encontrados quanto a produção de NO e EROs com desfecho clínico para obtenção de dados mais conclusivos.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Avaliar a produção de EROs e NO em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos, logo após as primeiras manifestações clínicas da sepse e a dinâmica dessa produção após 7 dias de tratamento.

Correlacionar a detecção de EROs e NO com idade, gênero, APACHE II (escore de mortalidade), SOFA (escore de disfunção orgânica) e mortalidade de alta hospitalar.

2. OBJETIVOS

Avaliar a produção de EROs e NO em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos, logo após as primeiras manifestações clínicas da sepse e a dinâmica dessa produção após 7 dias de tratamento.

Correlacionar a detecção de EROs e NO com idade, gênero, APACHE II (escore de mortalidade), SOFA (escore de disfunção orgânica) e mortalidade de alta hospitalar.

Material e métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

- PBS 0,15M pH 7,2 [8g NaCl (Labsynth, Diadema, SP, Brasil); 0,2g KH_2PO_4 (CAQ, Diadema, SP, Brasil); 1,15g Na_2HPO_4 (CAQ); 0,2g KCl (Labsynth) diluído em 1 litro de água destilada].
- Solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 3mM [0,111g EDTA (Sigma, Saint Louis, MO, EUA), diluído em 100mL de PBS].
- Solução de NaCl 0,2% (1g de NaCl diluído em 500mL de água destilada).
- Solução de NaCl 1,6% (8g de NaCl diluído em 500mL de água destilada).
- 2'7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH, Sigma, Saint Louis, MO, EUA), na concentração 0,3 mM diluído em PBS.
- 4-amino-5-metilamino- 2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM DA, Invitrogen Ltda, Carlsbad, Califórnia, EUA), na concentração 0,05 mM diluído em PBS.
- Anticorpo anti-CD14 conjugado a PerCP, clone MΦP9 (BD Bioscience, Qume Drive, San Jose, Califórnia, EUA).
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853, Oxoid Ltda, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra).
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, Oxoid Ltda, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra).
- Solução salina 0,8% (8g de NaCl diluído em 1000mL de água destilada).

- Meio Tryptic soy broth (TSB) (Difco - PROLAB Ltda, Brasil).

3.2. Casuística

3.2.1. Aspectos éticos e tamanho de amostra:

Voluntários sadios e pacientes sépticos foram incluídos no estudo após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido por ele mesmo ou por seu responsável legal. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP, CEP 0346/09 (Anexo 1).

Foram coletados 10mL de sangue em tubo à vácuo contendo heparina sódica (BD Bioscience) de pacientes sépticos e voluntários sadios. Os pacientes foram seguidos para obtenção de amostra após 7 dias, óbito ou alta hospitalar (tabela 1 e 2). As amostras foram processadas em até quatro horas no Laboratório de Imunologia I da Disciplina de Infectologia da UNIFESP/EPM.

Tabela 1: Número de amostras obtidas para mensuração de metabolismo oxidativo em monócitos e neutrófilos do sangue periférico.

Metabolismo oxidativo			
	Sadios	Pacientes	
		Dia 0	Dia 7
Monócitos	19	49	28
Neutrófilos	19	49	30

Tabela 2: Número de amostras obtidas para mensuração de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico.

Oxido nítrico			
	Sadios	Pacientes	
		Dia 0	Dia 7
Monócitos	19	48	28
Neutrófilos	19	49	29

3.2.2. Critérios de Inclusão:

Voluntários: Sadios, de faixas etárias e gêneros semelhantes aos pacientes, sem uso de medicação e que aceitaram participar espontaneamente do estudo.

Pacientes: Foram 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 (Bone et al. 1992) admitidos no 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.

3.2.3. Critérios de exclusão:

1. Pacientes menores de 18 anos ou com doença imunomoduladoras, como neoplasias ou Aids.
2. Pacientes que estivessem participando de 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.

3.3. Cultivo de bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

As bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* foram reidratadas em 1mL de meio TSB a 37°C até dissolver a película da haste. As cepas foram cultivadas em meio TSB líquido (30µL da solução reidratada em 30mL de meio TSB). O cultivo foi mantido em estufa a 37°C por cerca de 10 minutos (solução estoque). Após incubação 3mL da solução estoque foi adicionada a 30mL de TSB. A nova solução foi mantida a 37°C durante a noite sob agitação para proliferação das bactérias. Em seguida o cultivo foi colocado em banho-maria a 60°C por 30 minutos para matar/inativar as bactérias. Uma amostra da suspensão foi semeada em meio TSB e incubada em estufa 37°C por 48 horas, para certificação da morte das bactérias. A solução foi então centrifugada por 10 minutos a 3.800g e o sobrenadante foi desprezado. Foram realizadas 3 lavagens com solução salina 0,8% seguidas de centrifugação por 10 minutos a 3.800g. Após as lavagens as bactérias foram suspensas em solução salina 0,8% e a concentração foi acertada por turbidez com uso da escala de *MCFarland* n°8 (24×10^8 células/mL). Aliquotas da suspensão de bactérias foram estocadas a -20°C.

Um ensaio de dose-resposta foi realizado para avaliar a melhor concentração de *S. aureus* e *P. aeruginosa* a ser utilizada para estimular a produção de EROs e NO sem interferir na qualidade da amostra e no número de células adquiridas.

A melhor dose definida para mensuração de EROs foi 100µL de *S. aureus* ($2,4 \times 10^7$ células/mL) e 10µL de *P. aeruginosa* ($2,4 \times 10^6$ células/mL).

Para mensuração de NO a melhor dose definida foi 12µL para *S. aureus* e para *P. aeruginosa* ($2,88 \times 10^7$ células/mL).

3.4. Ensaio de metabolismo oxidativo de monócitos e neutrófilos por citometria de fluxo.

Para a mensuração do metabolismo oxidativo, foi avaliada a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) utilizando 200µL do reagente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) a 0,3mM. O DCFH-DA tem a propriedade de penetrar rapidamente nas células por meio de difusão. Uma vez no espaço intracelular é hidrolisado por esterases transformando-se em 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) que é um composto não fluorescente e impermeável à membrana celular. Este, por sua vez, reage com as EROs, em particular com o peróxido de hidrogênio, sofrendo oxidação, resultando em compostos altamente fluorescentes, diclorofluoresceína (DCF), cuja luz é captada no canal FL-1 do citômetro de fluxo (figura 1).

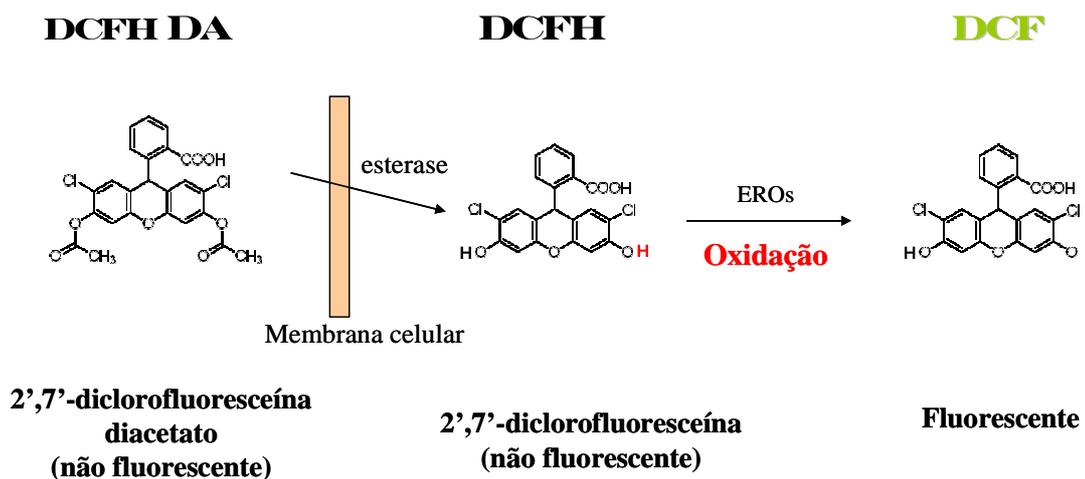


Figura 3: Esquema representativo da reação do DCFH-DA.

Nos ensaios foi observada a produção espontânea de espécies reativas de oxigênio, bem como a produção após os estímulos com *S. aureus* e *P.*

aeruginosa (24×10^8 células/mL), bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente (tabela 3).

Tabela 3: Estímulos utilizados no ensaio de metabolismo oxidativo de neutrófilos e monócitos por citometria de fluxo.

Metabolismo oxidativo					
		Sangue	DCFH	Estímulo	PBS
1	Controle	100 μ L	200 μ L	-	700 μ L
2	<i>S. aureus</i>	100 μ L	200 μ L	100 μ L	600 μ L
3	<i>Pseudomonas</i>	100 μ L	200 μ L	10 μ L	690 μ L
4	Branco	100 μ L	-	-	900 μ L
5	FL-1	100 μ L	200 μ L	-	700 μ L
6	FL-3	100 μ L	-	-	900 μ L
Volume final : 1000 μ L					

Os tubos foram incubados por 30 minutos em banho-maria a 37°C agitando-os de 10 em 10 minutos. Foram adicionados 2mL de solução EDTA a 3mM para bloquear a reação, seguido de centrifugação por 5 minutos a 515g. Foi realizada então lise hipotônica das hemácias, 2 ou 3 vezes, com NaCl 0,2% e 1,6% seguida de nova centrifugação a 515g por 5 minutos a 4°C. Após desprezar o sobrenadante os botões celulares foram incubados com 6 μ L de CD14-PerCP por 15 minutos no escuro. Os tubos receberam 2mL de PBS. Após nova centrifugação o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 250 μ L de EDTA 3mM para leitura em citômetro de fluxo e posterior análise.

3.5. Estimulação *in vitro* de sangue total para estudo da produção de óxido nítrico

Para mensuração da produção de NO foi utilizado 4-amino-5-metilamino- 2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM DA). Este composto atravessa passivamente as membranas celulares. Uma vez no interior das células, ele é deacetilado pelas esterases intracelulares, que o transformam em DAF-FM. Na presença de NO, a fluorescência do DAF-FM aumenta

formando o derivado benzotriazólico, cuja luz é detectada no canal FL-1 do citômetro de fluxo (Kojima et al.1999).

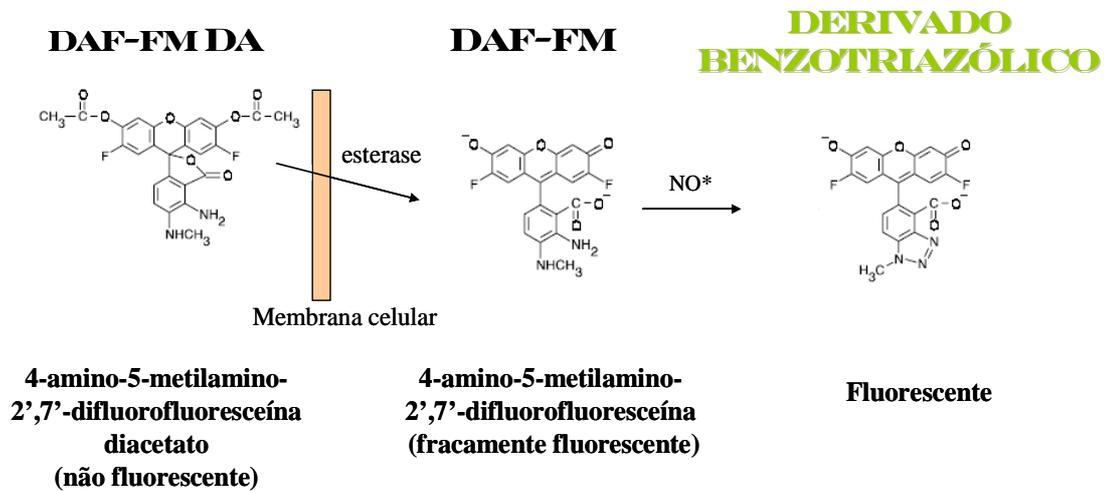


Figura 4: Reação esquemática para detecção de óxido nítrico por DAF-FM diacetado.

Oitenta microlitros de sangue heparinizado foram distribuídos em tubos de poliestireno de 5mL e posteriormente foram estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa* (24×10^8 células/mL), bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente. Foram acrescentados 24 μ L de DAF-FM DA 0,05mM por tubo e os volumes acertados com PBS para 120 μ L (tabela 4).

Tabela 4: Estímulos utilizados no ensaio de óxido nítrico de monócitos e neutrófilos por citometria de fluxo.

		Oxido nítrico			
		Sangue	DAF	Estímulo	PBS
1	Controle	80 μ L	24 μ L		16 μ L
2	S. aureus	80 μ L	24 μ L	12 μ L	4 μ L
3	Pseudomonas	80 μ L	24 μ L	12 μ L	4 μ L
4	Branco	80 μ L			40 μ L
5	FL-1	80 μ L	24 μ L		16 μ L
6	FL-3	80 μ L			40 μ L
Volume final : 120μL					

Os tubos então foram incubados em banho-maria a 37°C por 30min agitando-os de 10 em 10 minutos. Dado o tempo de incubação, foram adicionados 2mL de PBS. Os tubos foram centrifugados a 515g por 5min a 4°C e os sobrenadantes desprezados. As hemácias foram lisadas com adição de 2mL de NaCl 0,2% por 20 segundos, seguido de adição de 2mL de NaCl 1,6% por 20 segundos. Após centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e adicionados 2mL de PBS. Os tubos foram centrifugados e os sobrenadantes descartados. Os botões celulares foram incubados com 6µL de CD14-PerCP e deixados por 15min no escuro. Posteriormente, foram acrescentados 2mL de PBS, seguido de nova centrifugação. Após descarte dos sobrenadantes, as amostras foram suspensas adicionando-se 0,25mL de PBS por tubo e foram mantidos em geladeira até a leitura em citômetro de fluxo.

3.6. Aquisição e análise de dados para detecção da produção de Óxido Nítrico (NO) e Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).

A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences). O citômetro é acoplado à unidade constituída por microcomputador Macintosh Power PC, modelo G5 (Apple Computer Inc., Cupertino, CA, EUA). Tanto a aquisição dos eventos como a análise dos resultados, foram realizadas com auxílio do programa CellQuest Pro (BD Biosciences).

Para a aquisição dos dados foram utilizados dois gráficos de pontos (Figura 3). O primeiro, de dispersão frontal versus lateral de luz, foi utilizado para determinar uma região R1 de morfologia de monócitos e neutrófilos

(Figura 3A). Utilizando-se outro gráfico de dispersão lateral de luz versus expressão de CD14 foi delimitada uma região R2 para identificar eventos positivos para CD14 (marcador de monócitos - Figura 3B). Por meio da combinação das regiões R1 com R2, foram adquiridos 5000 eventos, os quais possuíam, portanto, morfologia de monócitos e positividade para CD14. Todos os eventos foram salvos.

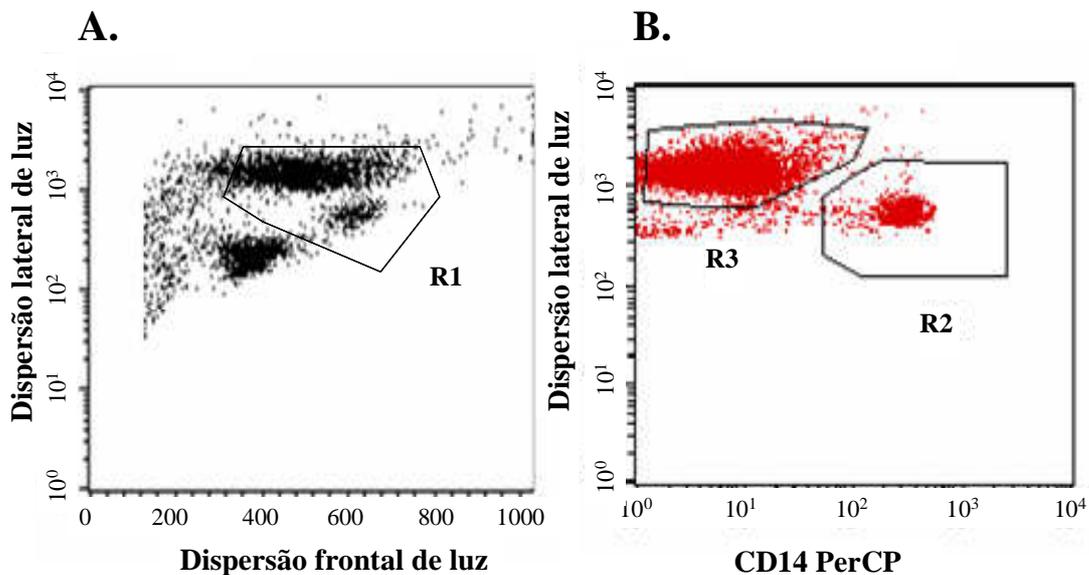


Figura 5: Estratégia de aquisição e análise da produção de EROs e NO em sangue total. O gráfico A mostra as dispersões frontal versus lateral de luz. A região 1 (R1) separa as populações de morfologia de monócitos e neutrófilos. O gráfico B mostra expressão de CD14 e dispersão lateral de luz. A região 3 (R3) corresponde aos neutrófilos (CD14-), enquanto a região 2 (R2) evidencia os monócitos (CD14+).

Para a análise, utilizou-se o gráfico de dispersões frontal versus lateral de luz para identificação das populações leucocitárias, estabelecendo-se assim a região R1 de neutrófilos e monócitos (Figura 3A). Em outro gráfico, foram criadas as regiões R2 e R3, baseadas na positividade e negatividade para CD14, respectivamente (figura 3B). Os eventos contidos nas duas combinações, isto é, R1xR2 (monócitos) e R1xR3 (neutrófilos) foram analisados em gráficos do tipo histograma sendo a intensidade de fluorescência relacionada à detecção de DCF ou DAF (figura 4 A e B), ou seja,

à produção de EROs e NO, respectivamente. Os resultados foram expressos em média geométrica de intensidade de fluorescência (MGIF) em FL-1.

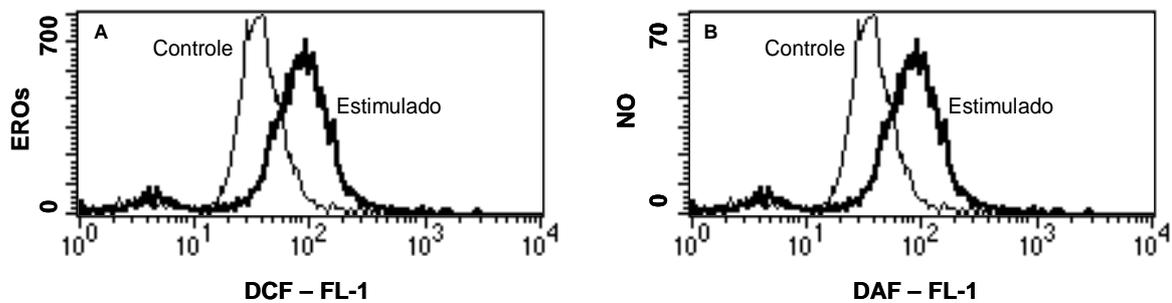


Figura 6: Estratégia de análise para detecção de EROs (A) e NO (B) em sangue total.

3.7. 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 correlação entre duas variáveis foi utilizado o teste coeficiente de correlação de Pearson.

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

4. RESULTADOS

4.1. Perfil geral da coorte

Foram incluídos no estudo 49 pacientes dos quais 2% apresentaram quadro de sepse, 28,6% de sepse grave e 69,4% de choque séptico.

Destes 57,1% são do gênero masculino, com média de idade de 60 ± 17 (com idade mínima de 18 e máxima de 87 anos). Os pacientes apresentaram um SOFA médio de $7,6\pm 3,9$ (com mínima de 0 e máxima de 16) e um APACHE médio de 17 ± 5 (com mínima de 4 e máxima de 30). A mortalidade média dos pacientes foi de 34,7% (tabela 5). Dos pacientes incluídos 30 foram submetidos a uma nova coleta após sete dias de seguimento (D7).

Também foram incluídos 19 indivíduos sadios de idade e gênero semelhantes aos pacientes. Destes 52,6% são do gênero masculino com média de idade de $55,32\pm 18$ (com idade mínima de 22 e máxima de 82 anos).

Tabela 5: Características principais da coorte incluída no estudo:

N = 49	
Variável	
Idade (Média \pm DP [anos])	60 \pm 17
Gênero (N[%])	
Masculino	28 (57,1)
Feminino	21 (42,9)
Classificação (N[%])	
Sepse	1 (2)
Sepse grave	14(28,6)
Choque séptico	34(69,4)
SOFA	7,6 \pm 3,9
APACHE II	17 \pm 5

4.2. Produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos e neutrófilos do sangue periférico.

4.2.1 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes na coleta D0 em relação a sadios.

A produção de metabolismo oxidativo nos monócitos foi maior nos pacientes sépticos do que nos controles sadios. Foi observada significância estatística em todas as condições analisadas: Sem estímulo ($P < 0,001$), *P. aeruginosa* ($P < 0,001$) e *S. aureus* ($P < 0,001$) (figura 7 e tabela 6).

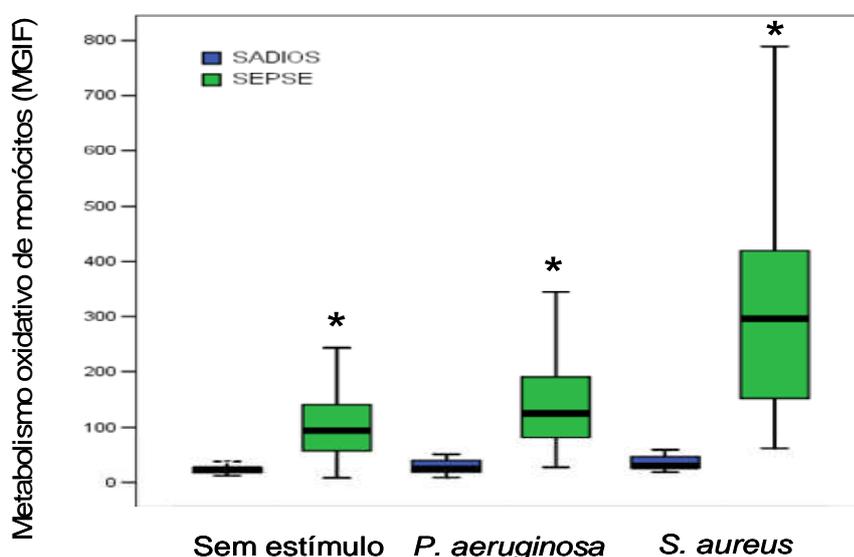


Figura 7: Metabolismo oxidativo de monócitos de 48 pacientes (D0) e 19 controles sadios em diferentes condições (Sem estímulo, estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*). Os monócitos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência (MGIF) da expressão de DCFH. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas) e mediana dos grupos. * $P < 0,05$ em relação aos sadios (Mann-Whitney).

Tabela 6: Metabolismo oxidativo em monócitos do sangue periférico de indivíduos sadios e pacientes sépticos no dia 0. Os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DCFH.

	Média	Desvio padrão	Mínima	Máxima
Sadios				
Sem estímulo	125,68	124,50	7,92	770,12
<i>P. aeruginosa</i>	177,01	145,11	7,92	633,81
<i>S. aureus</i>	347,22	264,09	61,17	1350,52
Pacientes				
Sem estímulo	125,68	124,50	7,92	770,12
<i>P. aeruginosa</i>	177,01	145,11	7,92	633,81
<i>S. aureus</i>	347,22	264,09	61,17	1350,52

A produção de metabolismo oxidativo nos neutrófilos foi maior nos pacientes sépticos do que nos controles sadios, sendo que a intensidade de fluorescência foi superior a dos monócitos. Foi observada significância estatística em todas as condições analisadas: Sem estímulo ($P < 0,001$), *P. aeruginosa* ($P < 0,001$) e *S. aureus* ($P < 0,001$) (figura 8 e tabela 7).

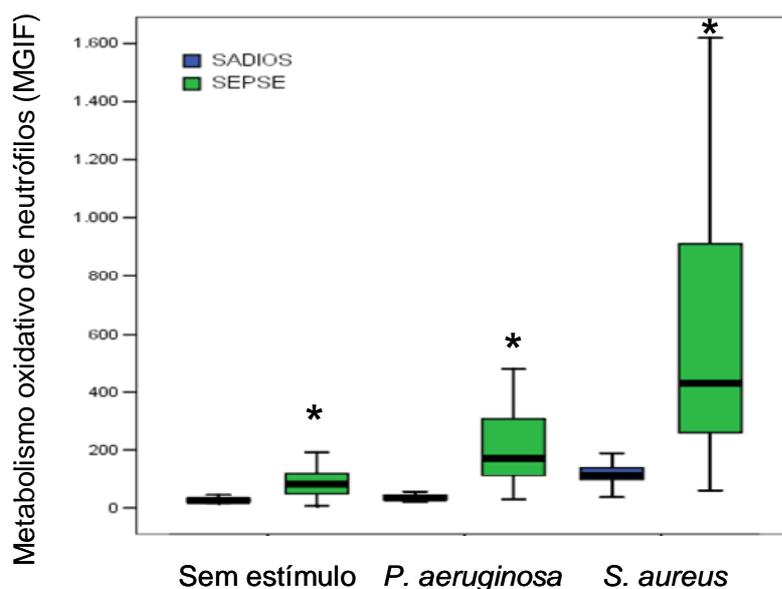


Figura 8: Metabolismo oxidativo de neutrófilos de 49 pacientes (D0) e 19 controles sadios em diferentes condições (Sem estímulo, estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*). Os neutrófilos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e negatividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência (MGIF) da expressão de DCFH. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas) e mediana dos grupos. * $P < 0,05$ em relação aos sadios (Mann-Whitney).

Tabela 7: Metabolismo oxidativo em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos sadios e pacientes sépticos no dia 0. Os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DCFH.

	Média	Desvio padrão	Mínima	Máxima
Sadios				
Sem estímulo	29,36	18,10	14,50	95,74
<i>P. aeruginosa</i>	42,86	28,96	19,10	123,86
<i>S. aureus</i>	114,84	44,72	35,88	188,74
Pacientes				
Sem estímulo	109,71	118,40	6,43	636,34
<i>P. aeruginosa</i>	286,73	346,28	28,81	2004,38
<i>S. aureus</i>	684,91	646,23	58,99	2833,70

4.2.2 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes em sepse grave e choque séptico na coleta D0.

Uma nova análise foi realizada separando os pacientes segundo o diagnóstico de sepse grave e choque séptico. As figuras 9 e 10 mostram que a produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos e neutrófilos, respectivamente, não apresentaram diferença entre os grupos de pacientes com sepse grave e choque séptico (tabelas 8 e 9).

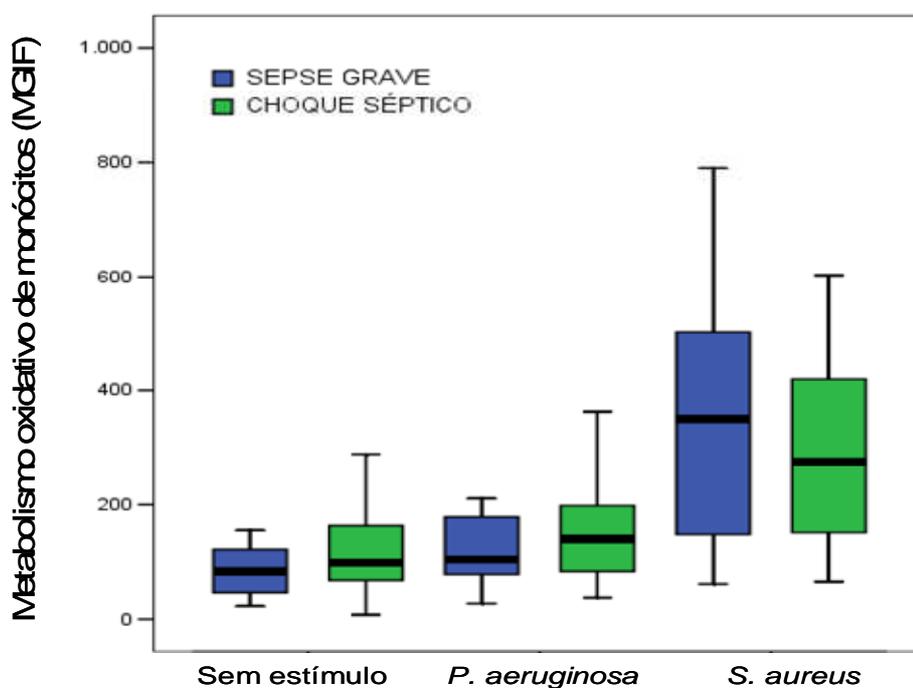


Figura 9: Metabolismo oxidativo de monócitos de 14 pacientes com sepse grave e 33 pacientes com choque séptico na coleta do dia 0 em diferentes condições (Sem estímulo, estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*). Os monócitos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DCFH. Não houve diferença significativa entre os grupos (Mann-Whitney).

Tabela 8: Metabolismo oxidativo em monócitos do sangue periférico de pacientes com sepse grave e choque séptico no dia 0. Os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DCFH.

	Média	Desvio padrão	Mínima	Máxima
Sepse grave				
Sem estímulo	109,55	112,54	22,42	476,34
<i>P. aeruginosa</i>	160,73	158,09	27,28	633,81
<i>S. aureus</i>	397,71	340,31	61,17	1350,52
Choque séptico				
Sem estímulo	132,71	132,11	7,92	770,12
<i>P. aeruginosa</i>	185,25	143,29	37,53	624,86
<i>S. aureus</i>	325,05	228,26	65,28	990,78

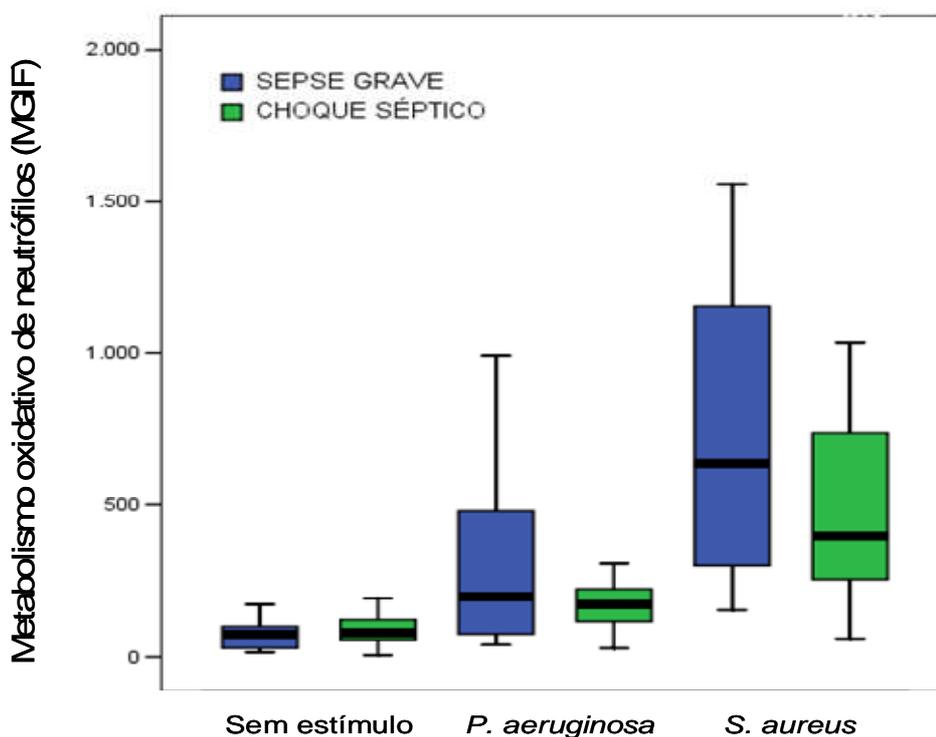


Figura 10: Metabolismo oxidativo de neutrófilos de 14 pacientes com sepse grave e 34 pacientes com choque séptico na coleta do dia 0 em diferentes condições (Sem estímulo, estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*). Os neutrófilos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e negatividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DCFH. Não houve diferença significativa entre os grupos (Mann-Whitney).

Tabela 9: Metabolismo oxidativo em neutrófilos do sangue periférico de pacientes com sepse grave e choque séptico no dia 0. Os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DCFH.

	Média	Desvio padrão	Mínima	Máxima
Sepse grave				
Sem estímulo	119,32	149,32	16,05	540,97
<i>P. aeruginosa</i>	306,29	296,37	40,11	991,26
<i>S. aureus</i>	834,45	728,91	153,21	2833,70
Choque séptico				
Sem estímulo	105,70	107,48	6,43	636,34
<i>P. aeruginosa</i>	277,49	373,51	28,81	2004,38
<i>S. aureus</i>	621,08	619,30	58,99	2362,04

4.2.3 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos na coleta do D0 em relação ao desfecho (sobrevida ou óbito) na alta hospitalar.

Não houve diferença na produção de espécies reativas de oxigênio em monócitos (figura 11 e tabela 10) e neutrófilos (figura 12 e tabela 11) do sangue periférico entre pacientes que sobreviveram e que evoluíram para óbito em todas as situações analisadas.

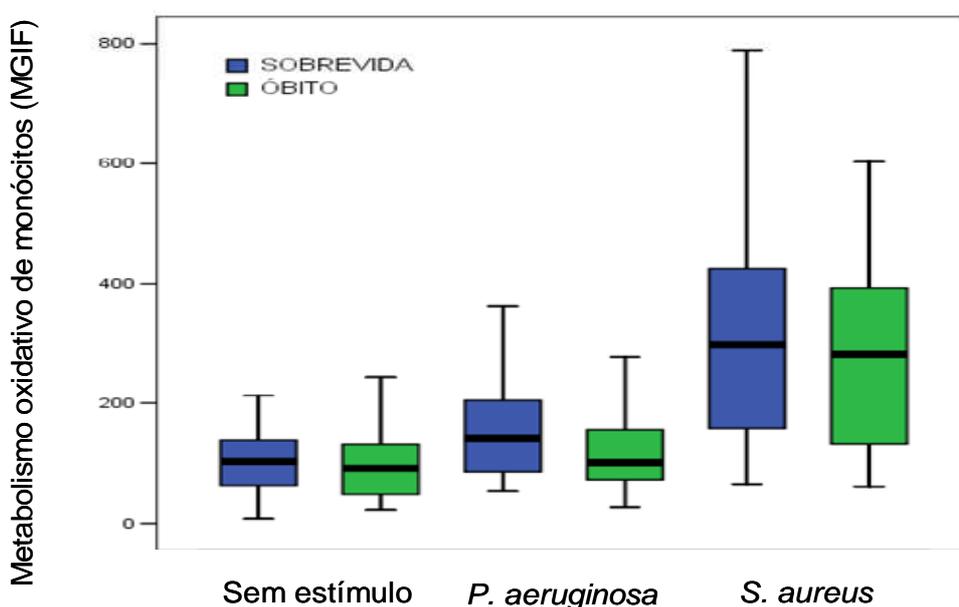


Figura 11: Metabolismo oxidativo em monócitos de 47 pacientes no dia 0 em relação a mortalidade (alta hospitalar) em diferentes condições (Sem estímulo, estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*). Os monócitos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DCFH. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas) e mediana dos grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos (Mann-Whitney).

Tabela 10: Metabolismo oxidativo em monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos no D0 em relação a mortalidade (alta hospitalar). Os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DCFH.

	Média	Desvio padrão	Mínima	Máxima
Sobrevida				
Sem estímulo	138,31	150,17	7,92	770,12
<i>P. aeruginosa</i>	205,24	166,58	53,67	633,81
<i>S. aureus</i>	371,66	308,07	65,28	1350,52
Óbito				
Sem estímulo	101,73	60,82	22,42	243,74
<i>P. aeruginosa</i>	131,01	90,57	27,28	344,75
<i>S. aureus</i>	293,65	171,99	61,17	602,78

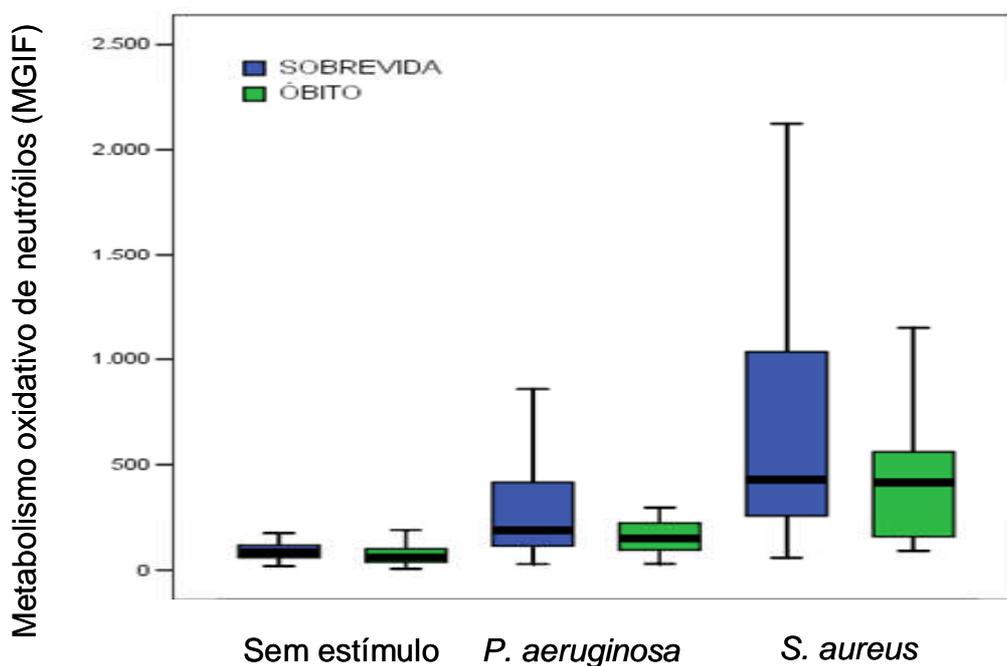


Figura 12: Metabolismo oxidativo em neutrófilos de 48 pacientes no dia 0 em relação a mortalidade (alta hospitalar) em diferentes condições (Sem estímulo, estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*). Os neutrófilos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e negatividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DCFH. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas) e mediana dos grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos (Mann-Whitney).

Tabela 11: Metabolismo oxidativo de neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos no D0 em relação a mortalidade (alta hospitalar). Os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DCFH.

	Média	Desvio padrão	Mínima	Máxima
Sobrevida				
Sem estímulo	128,57	140,88	18,81	636,34
<i>P. aeruginosa</i>	348,84	410,60	28,81	2004,38
<i>S. aureus</i>	789,18	743,99	58,99	2833,70
Óbito				
Sem estímulo	74,44	53,10	6,43	191,12
<i>P. aeruginosa</i>	178,23	152,39	29,53	686,01
<i>S. aureus</i>	445,99	296,61	92,29	1151,87

4.2.4 Correlação da produção de espécies reativas de oxigênio em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos com idade, gênero, SOFA e APACHE II na coleta D0.

Foi realizado teste de Pearson para avaliar a correlação da produção de espécies reativas de oxigênio em monócitos e neutrófilos entre idade, gênero, SOFA e APACHE II. Não foi encontrada correlação entre a produção de EROs e as variáveis analisadas (tabela 12).

Tabela 12: Correlação do metabolismo oxidativo com idade, gênero, SOFA e APACHE II em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de 49 pacientes no dia 0 (teste de correlação de Pearson). A tabela mostra os valores de *P* obtidos. Não houve diferença significativa.

	Idade (anos)	Gênero	SOFA	APACHE II
Monócitos				
Sem estímulo	0,097	0,847	0,415	0,501
<i>P. aeruginosa</i>	0,177	0,557	0,940	0,936
<i>S. aureus</i>	0,510	0,585	0,795	0,765
Neutrófilos				
Sem estímulo	0,389	0,951	0,200	0,927
<i>P. aeruginosa</i>	0,657	0,357	0,743	0,880
<i>S. aureus</i>	0,491	0,748	0,411	0,916

4.2.5 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes na coleta D0 e D7.

A figura 13 e a tabela 13 mostram a produção de espécies reativas de oxigênio em monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos na coleta (D0) e após sete dias de seguimento (D7). A produção de EROs foi maior no D0 comparado ao D7 em todas as situações analisadas: Sem estímulo ($P < 0,001$), *P. aeruginosa* ($P < 0,001$) e *S. aureus* ($P < 0,001$).

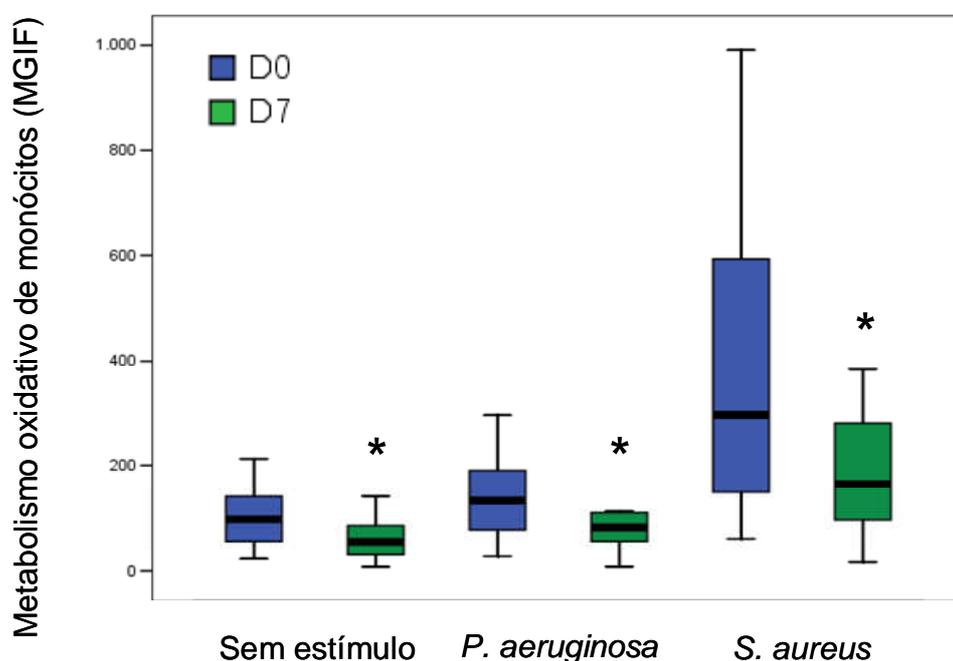


Figura 13: Metabolismo oxidativo em monócitos de 28 pacientes sépticos no D0 e D7 em diferentes condições (Sem estímulo, estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*). Os monócitos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DCFH. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos. * $P < 0,05$ quando comparados os grupos D7 e D0 (Wilcoxon).

Tabela 13: Metabolismo oxidativo em monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos no D0 e D7. Os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DCFH.

	Média	Desvio padrão	Mínima	Máxima
D0				
Sem estímulo	114,96	87,85	22,42	476,34
<i>P. aeruginosa</i>	174,64	151,71	27,28	633,81
<i>S. aureus</i>	398,67	316,67	61,17	1350,52
D7				
Sem estímulo	64,79	47,71	7,62	230,12
<i>P. aeruginosa</i>	106,83	91,04	8,08	414
<i>S. aureus</i>	215,60	167,87	16,67	725,61

A produção de espécies reativas de oxigênio nos neutrófilos mostrou-se aumentada no D0 em relação ao D7 na situação estimulado com *S. aureus* ($P < 0,05$). As situações sem estímulo e estimulado com *P. aeruginosa* não apresentaram significância estatística (figura 14 e tabela 14).

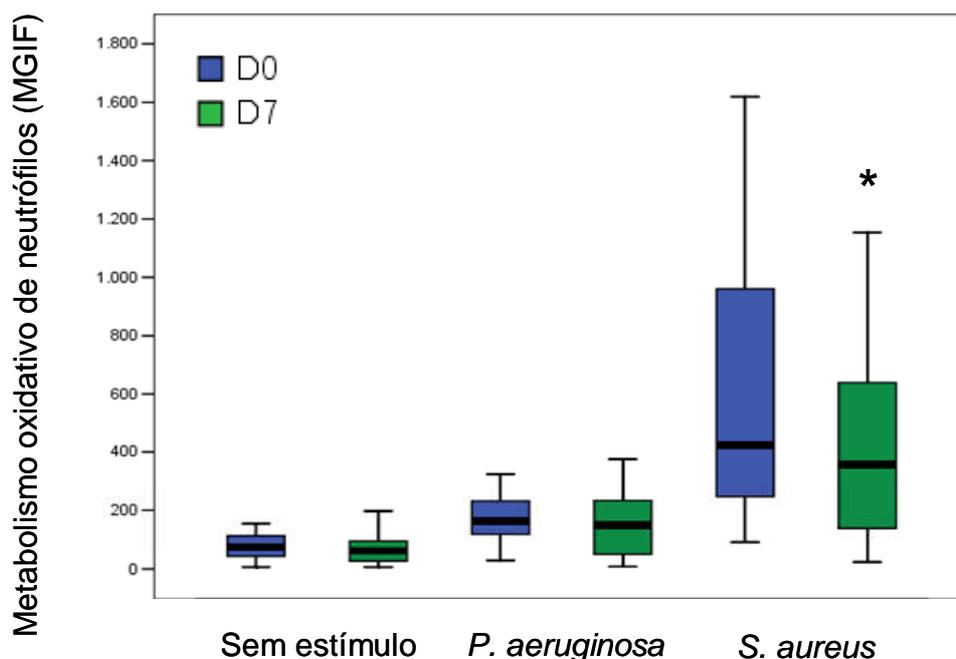


Figura 14: Metabolismo oxidativo em neutrófilos de 30 pacientes sépticos nas coletas do D0 e D7 em diferentes condições (Sem estímulo, estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*). Os neutrófilos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e negatividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DCFH. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos. * $P < 0,05$ quando comparados os grupos D7 e D0 (Wilcoxon).

Tabela 14: Metabolismo oxidativo em neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos no D0 e D7. Os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DCFH.

	Média	Desvio padrão	Mínima	Máxima
D0				
Sem estímulo	100,25	108,47	540,97	100,25
<i>P. aeruginosa</i>	290,11	385,75	2004,38	290,11
<i>S. aureus</i>	734,83	709,59	2833,70	734,83
D7				
Sem estímulo	69,79	54,82	238,85	69,79
<i>P. aeruginosa</i>	180,19	173,74	761,28	180,19
<i>S. aureus</i>	424,81	319,57	1154,23	424,81

4.2.6 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes na admissão e após 7 dias de seguimento em relação ao desfecho (sobrevida ou óbito) na alta hospitalar.

A produção de espécies reativas de oxigênio nos monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos ao longo do seguimento se mostrou diminuída no D7 em relação ao D0 nos pacientes que sobreviveram até a alta hospitalar em todas as situações analisadas: Sem estímulo ($P < 0,001$), *P. aeruginosa* ($P < 0,002$) e *S. aureus* ($P < 0,004$) (figura 15 e tabela 15).

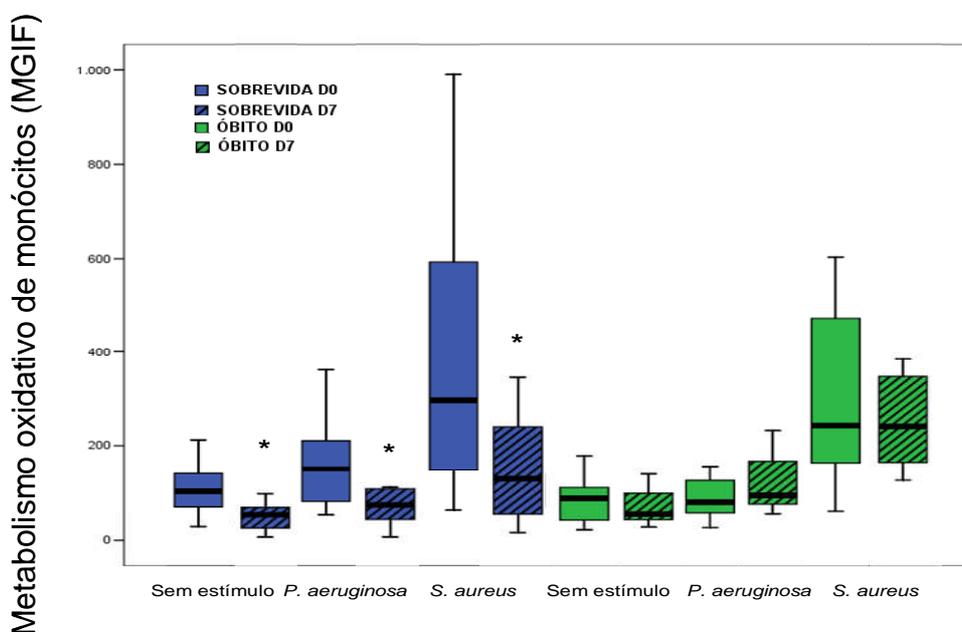


Figura 15: Metabolismo oxidativo em monócitos de 27 pacientes sépticos no seguimento (D0 e D7) em relação a mortalidade (alta hospitalar) em diferentes condições (Sem estímulo, estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*). Os monócitos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DCFH. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos. * $P < 0,05$ em relação ao D0 (Wilcoxon).

Tabela 15: Metabolismo oxidativo em monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos no seguimento (D0 e D7) em relação a mortalidade (alta hospitalar). Os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DCFH.

	Média		Desvio padrão		Mínima		Máxima	
	sobrevida	óbito	sobrevida	óbito	sobrevida	óbito	sobrevida	óbito
D0	127,54	80,22	98,37	53,49	29,31	22,42	476,34	178,03
Sem estímulo	204,84	107,21	170,51	78,61	53,67	27,28	633,81	277,06
<i>P. aeruginosa</i>	425,32	313,79	362,37	194,48	65,28	61,17	1350,52	602,78
<i>S. aureus</i>								
D7								
Sem estímulo	62,98	65,21	50,96	44,21	7,62	10,19	230,12	141,13
<i>P. aeruginosa</i>	105,57	110,19	99,67	80,01	8,08	9,78	414,00	232,25
<i>S. aureus</i>	199,44	253,75	189,31	108,69	16,67	127,56	725,61	384,25

Nos neutrófilos a produção de espécies reativas de oxigênio mostrou-se diminuída no D7 em relação ao D0 nos pacientes que sobreviveram até a alta hospitalar somente nas situações estimulados com *P. aeruginosa* ($P<0,040$) e *S. aureus* ($P<0,020$) (figura 16 e tabela16).

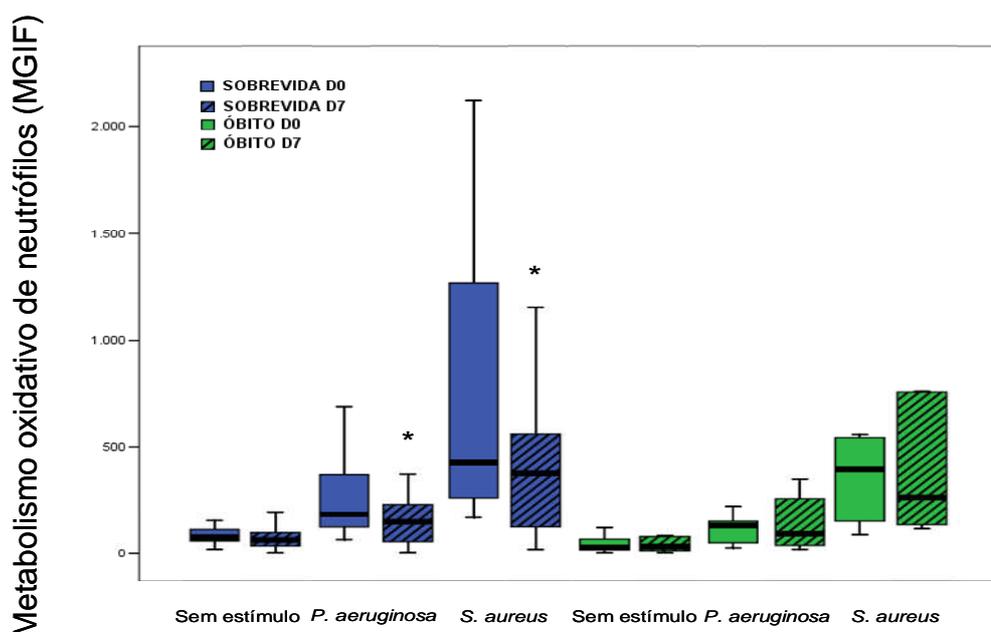


Figura 16: Metabolismo oxidativo em neutrófilos de 29 pacientes sépticos no seguimento (D0 e D7) em relação a mortalidade (alta hospitalar) em diferentes condições (Sem estímulo, estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*). Os neutrófilos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e negatividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DCFH. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos. * $P< 0,05$ em relação ao D0 (Wilcoxon).

Tabela 16: Metabolismo oxidativo em neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos no seguimento (D0 e D7) em relação a mortalidade (alta hospitalar). Os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DCFH.

	Média		Desvio padrão		Mínima		Máxima	
	sobreviva	óbito	sobreviva	óbito	sobreviva	óbito	sobreviva	óbito
D0								
Sem estímulo	121,96	49,32	124,61	40,01	21,68	6,43	540,97	126,34
<i>P. aeruginosa</i>	364,63	133,88	454,70	78,45	67,07	29,53	2004,38	261,83
<i>S. aureus</i>	825,80	444,61	801,82	322,05	170,27	92,29	2833,70	1151,87
D7								
Sem estímulo	80,47	43,00	60,20	33,16	6,57	6,74	238,85	88,50
<i>P. aeruginosa</i>	180,82	178,37	145,62	243,01	7,34	23,58	514,11	761,28
<i>S. aureus</i>	423,22	400,58	336,89	304,11	22,28	120,04	1154,23	761,38

4.3. Análise da produção de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico.

4.3.1 Análise da produção de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes na coleta D0 em relação a sadios.

A produção de óxido nítrico por monócitos do sangue periférico foi maior nos pacientes sépticos em relação aos sadios em todas as condições analisadas: Sem estímulo ($P < 0,001$), *P. aeruginosa* ($P < 0,001$) e *S. aureus* ($P < 0,001$) (figura 17 e tabela 17).

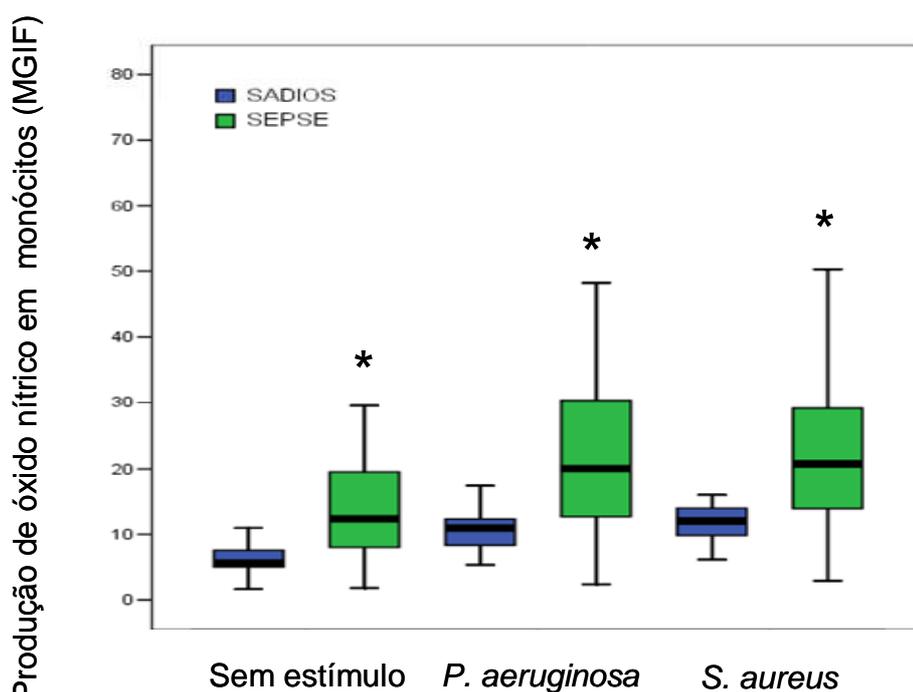


Figura 17: Produção de óxido nítrico em monócitos de 48 pacientes (D0) e 19 controles sadios em diferentes condições (Sem estímulo, estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*). Os monócitos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DAF. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas) e mediana dos grupos. * $P < 0,05$ em relação aos sadios (Mann-Whitney).

Tabela 17: Produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes sépticos no dia 0. Os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DAF.

	Média	Desvio padrão	Mínima	Máxima
Sadios				
Sem estímulo	5,86	2,30	1,61	10,94
<i>P. aeruginosa</i>	11,43	5,01	5,23	27,8
<i>S. aureus</i>	11,69	4,26	2,92	22,94
Pacientes				
Sem estímulo	16,28	13,71	1,77	73,02
<i>P. aeruginosa</i>	24,49	18,13	2,35	83,64
<i>S. aureus</i>	25,03	18,17	2,86	91,6

A produção de óxido nítrico nos neutrófilos foi maior nos pacientes sépticos do que nos saudáveis na situação sem estímulo ($P < 0,001$). Os estímulos com *P. aeruginosa* e *S. aureus* não apresentaram significância estatística. Entretanto, os pacientes apresentaram uma capacidade de resposta preservada em relação aos saudáveis (figura 18 e tabela 18).

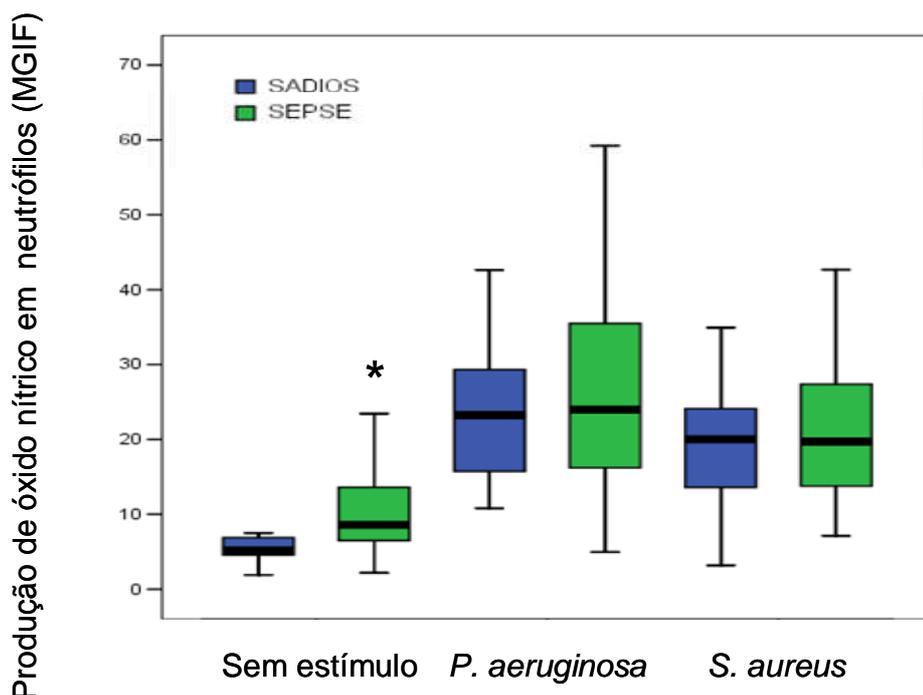


Figura 18: Produção de óxido nítrico em neutrófilos de 49 pacientes (D0) e 19 controles saudáveis em diferentes condições (Sem estímulo, estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*). Os neutrófilos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e negatividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DAF. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas) e mediana dos grupos. * $P < 0,05$ em relação aos saudáveis (Mann-Whitney).

Tabela 18: Produção de óxido nítrico em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes sépticos no dia 0. Os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DAF.

	Média	Desvio padrão	Mínima	Máxima
Sadios				
Sem estímulo	5,75	3,12	1,88	16,88
<i>P. aeruginosa</i>	22,92	8,87	10,81	42,6
<i>S. aureus</i>	20,48	9,88	3,14	44,47
Pacientes				
Sem estímulo	11,11	7,87	2,13	38,71
<i>P. aeruginosa</i>	27,20	16,76	4,85	76,06
<i>S. aureus</i>	22,99	16,01	7,16	90,02

4.3.2 Análise da produção de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes em sepse grave e choque séptico na coleta D0.

Também se analisou a produção de óxido nítrico nos pacientes classificados com quadro clínico de sepse grave e choque séptico. As figuras 19 e 20 e as tabelas 19 e 20 mostram esta produção em monócitos e neutrófilos do sangue periférico, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os grupos de sepse grave e choque séptico.

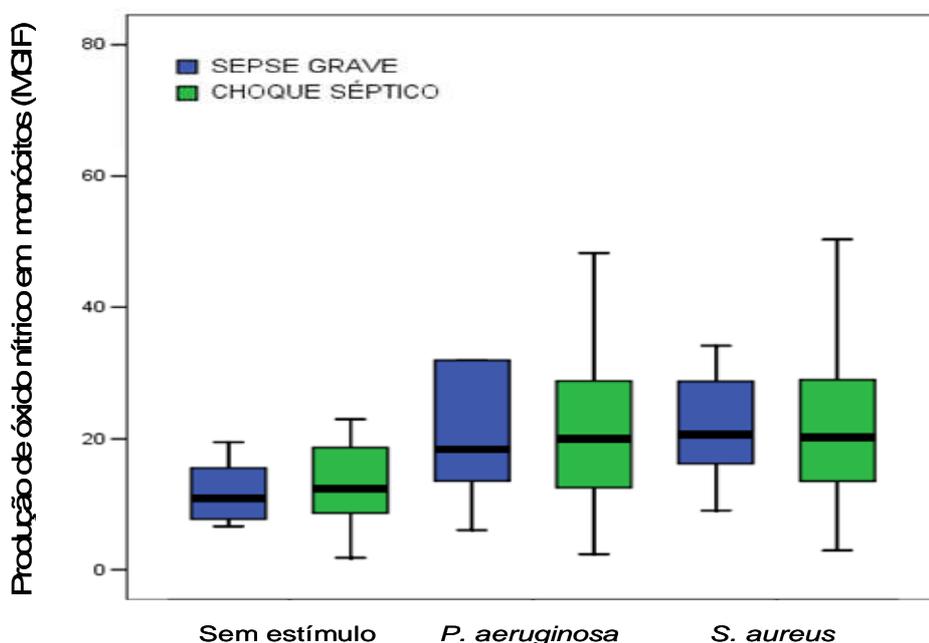


Figura 19: Produção de óxido nítrico em monócitos de 13 pacientes com sepse grave e 33 pacientes com choque séptico na coleta do dia 0 em diferentes condições (Sem estímulo, estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*). Os monócitos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DAF. Não houve diferença significativa entre os grupos (Mann-Whitney).

Tabela 19: Produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de pacientes com sepse grave e choque séptico no dia 0. Os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DAF.

	Média	Desvio padrão	Mínima	Máxima
Sepse grave				
Sem estímulo	15,42	13,26	6,49	53,95
<i>P. aeruginosa</i>	28,90	23,65	5,93	73,78
<i>S. aureus</i>	26,01	19,87	9,04	86,33
Choque séptico				
Sem estímulo	16,41	14,23	1,77	73,02
<i>P. aeruginosa</i>	22,87	15,86	2,35	83,64
<i>S. aureus</i>	24,68	18,06	2,86	91,60

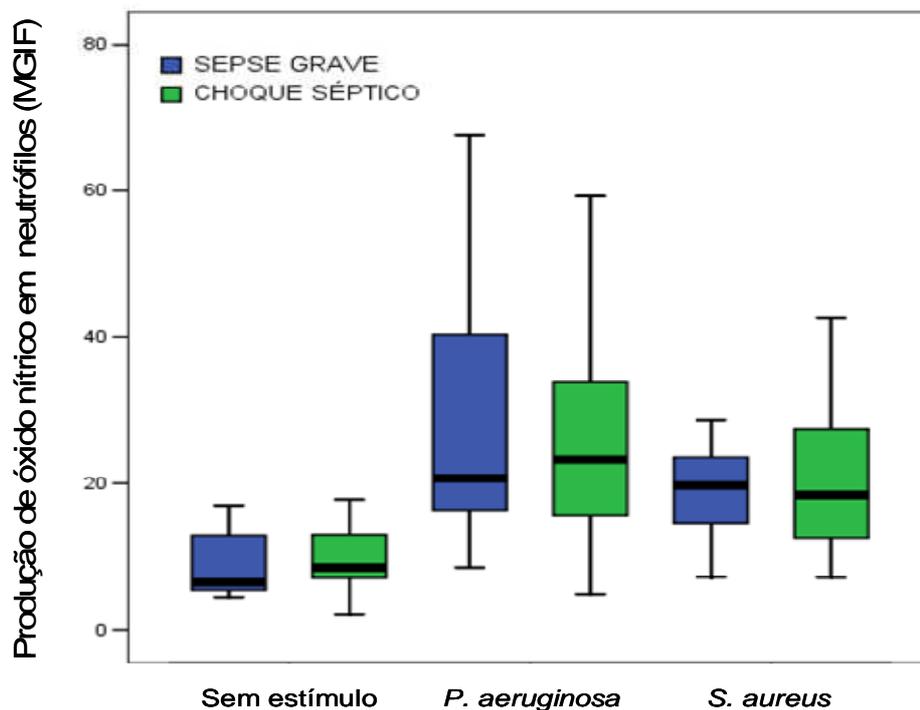


Figura 20: Produção de óxido nítrico em neutrófilos de 13 pacientes com sepse grave e 34 pacientes com choque séptico na coleta do dia 0 em diferentes condições (Sem estímulo, estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*). Os neutrófilos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e negatividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DAF. Não houve diferença significativa entre os grupos (Mann-Whitney).

Tabela 20: Produção de óxido nítrico em neutrófilos do sangue periférico de pacientes com sepse grave e choque séptico no dia 0. Os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DCFH.

	Média	Desvio padrão	Mínima	Máxima
Sepse grave				
Sem estímulo	10,45	8,12	4,43	33,97
<i>P. aeruginosa</i>	28,64	18,88	8,57	67,65
<i>S. aureus</i>	22,62	17,05	7,19	75,59
Choque séptico				
Sem estímulo	11,26	7,98	2,13	38,71
<i>P. aeruginosa</i>	26,41	16,35	4,85	76,06
<i>S. aureus</i>	22,92	16,05	7,16	90,02

4.3.3 Análise da produção de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos na coleta do D0 em relação ao desfecho (sobrevida ou óbito) na alta hospitalar.

Não houve diferença na produção de óxido nítrico em monócitos (figura 21 e tabela 21) e neutrófilos (figura 22 e tabela 22) do sangue periférico entre pacientes que sobreviveram e que evoluíram para óbito no D0 em todas as situações analisadas.

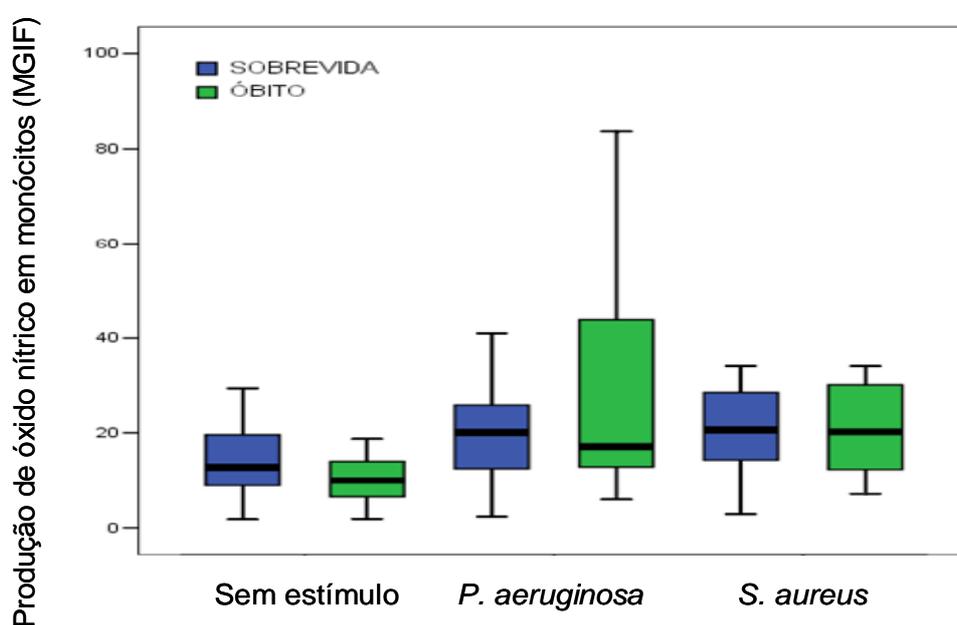


Figura 21: Produção de óxido nítrico em monócitos de 46 pacientes no dia 0 em relação a mortalidade (alta hospitalar) em diferentes condições (Sem estímulo, estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*). Os monócitos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DAF. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas) e mediana dos grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos (Mann-Whitney).

Tabela 21: Produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos no D0 em relação a mortalidade (alta hospitalar). Os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DAF.

	Média	Desvio padrão	Mínima	Máxima
Sobrevida				
Sem estímulo	15,51	9,24	1,77	40,83
<i>P. aeruginosa</i>	21,79	13,72	2,35	73,78
<i>S. aureus</i>	22,68	11,69	2,86	57,70
Óbito				
Sem estímulo	17,70	19,68	1,87	73,02
<i>P. aeruginosa</i>	29,23	24,05	5,93	83,64
<i>S. aureus</i>	29,28	26,07	7,10	91,60

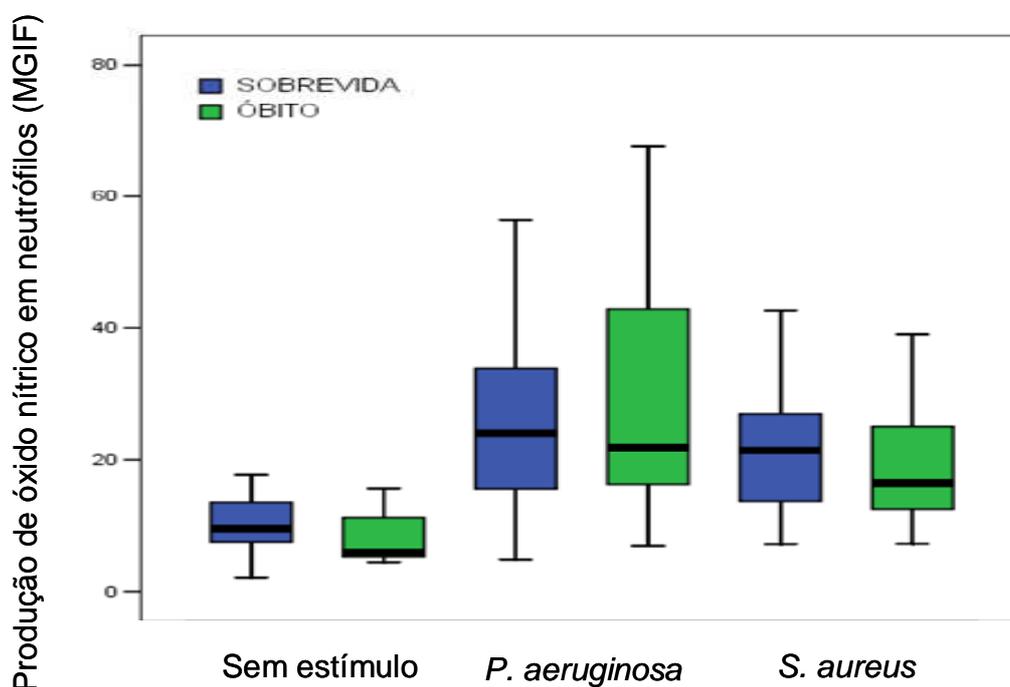


Figura 22: Produção de óxido nítrico em neutrófilos de 47 pacientes no dia 0 em relação a mortalidade (alta hospitalar) em diferentes condições (Sem estímulo, estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*). Os neutrófilos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e negatividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DAF. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas) e mediana dos grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos (Mann-Whitney).

Tabela 22: Produção de óxido nítrico em neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos no D0 em relação a mortalidade (alta hospitalar). Os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DAF.

	Média	Desvio padrão	Mínima	Máxima
Sobrevida				
Sem estímulo	11,24	6,56	2,13	36,59
<i>P. aeruginosa</i>	26,28	16,12	4,85	76,06
<i>S. aureus</i>	22,76	15,31	7,16	90,02
Óbito				
Sem estímulo	10,93	10,20	4,43	38,71
<i>P. aeruginosa</i>	28,25	18,59	6,86	67,65
<i>S. aureus</i>	23,06	18,05	7,19	75,59

4.3.4 Correlação da produção de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos com idade, gênero SOFA e APACHE II na coleta D0.

Foi realizado teste de Pearson para avaliar a correlação da produção de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos entre idade, gênero, SOFA, APACHE II. Não foi encontrada correlação entre a produção de NO e as variáveis analisadas (tabela 23).

Tabela 23: Correlação da produção de óxido nítrico com idade, gênero, SOFA e APACHE II em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de 49 pacientes no dia 0 (teste de correlação de Pearson). A tabela mostra os valores de *P* obtidos. Não houve diferença significativa.

	Idade (anos)	Gênero	SOFA	APACHE II
Monócitos				
Sem estímulo	0,183	0,534	0,854	0,474
<i>P. aeruginosa</i>	0,972	0,289	0,392	0,694
<i>S. aureus</i>	0,197	0,716	0,777	0,447
Neutrófilos				
Sem estímulo	0,070	0,868	0,672	0,449
<i>P. aeruginosa</i>	0,882	0,689	0,653	0,824
<i>S. aureus</i>	0,183	0,413	0,658	0,521

4.3.5 Análise da produção de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes na coleta D0 e D7.

A produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos mostrou-se aumentada no D0 comparada ao D7 na situação sem estímulo ($P < 0,05$). Os estímulos com *P. aeruginosa* e *S. aureus* não apresentaram significância estatística (figura 23 e tabela 24).

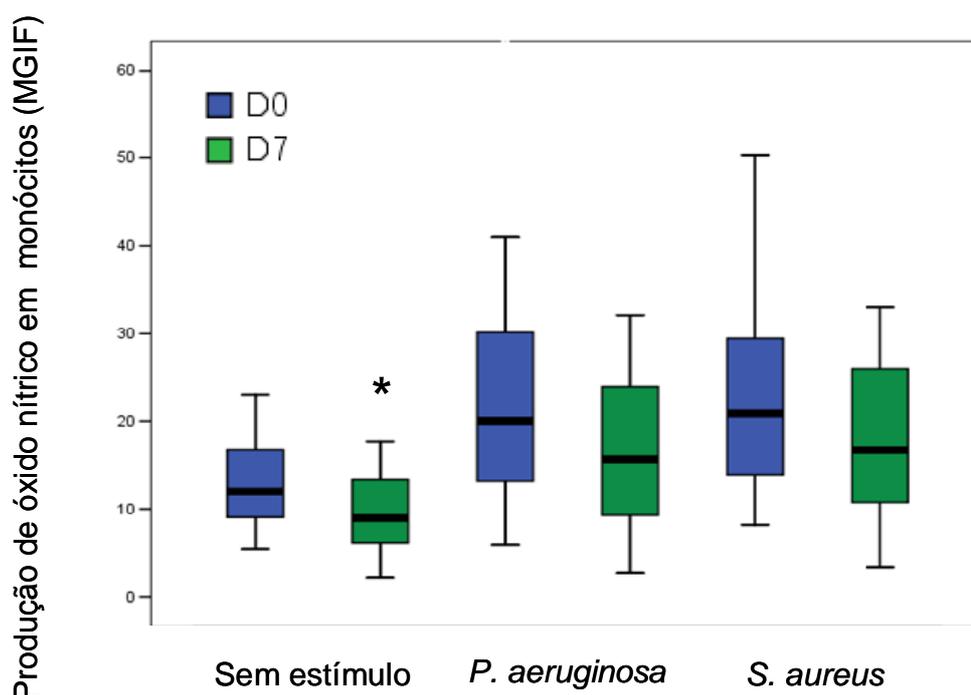


Figura 23: Produção de óxido nítrico em monócitos de 28 pacientes sépticos no D0 e D7 em diferentes condições (Sem estímulo, estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*). Os monócitos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DAF. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos. * $P < 0,05$ quando comparados os grupos D7 e D0 (Wilcoxon).

Tabela 24: Produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos no D0 e D7. Os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DAF.

	Média	Desvio padrão	Mínima	Máxima
D0				
Sem estímulo	17,80	15,62	5,45	73,02
<i>P. aeruginosa</i>	25,21	19,16	5,93	83,64
<i>S. aureus</i>	27,29	20,82	8,17	91,6
D7				
Sem estímulo	10,63	8,26	2,15	35,64
<i>P. aeruginosa</i>	18,65	15,03	2,78	66,1
<i>S. aureus</i>	18,96	11,61	3,45	53,69

A figura 24 e a tabela 25 mostram a produção de óxido nítrico em neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos no D0 e no D7. Foi observada maior produção no D0 comparado ao D7 na situação sem estímulo ($P < 0,05$) e estimulado com *S. aureus* ($P < 0,05$).

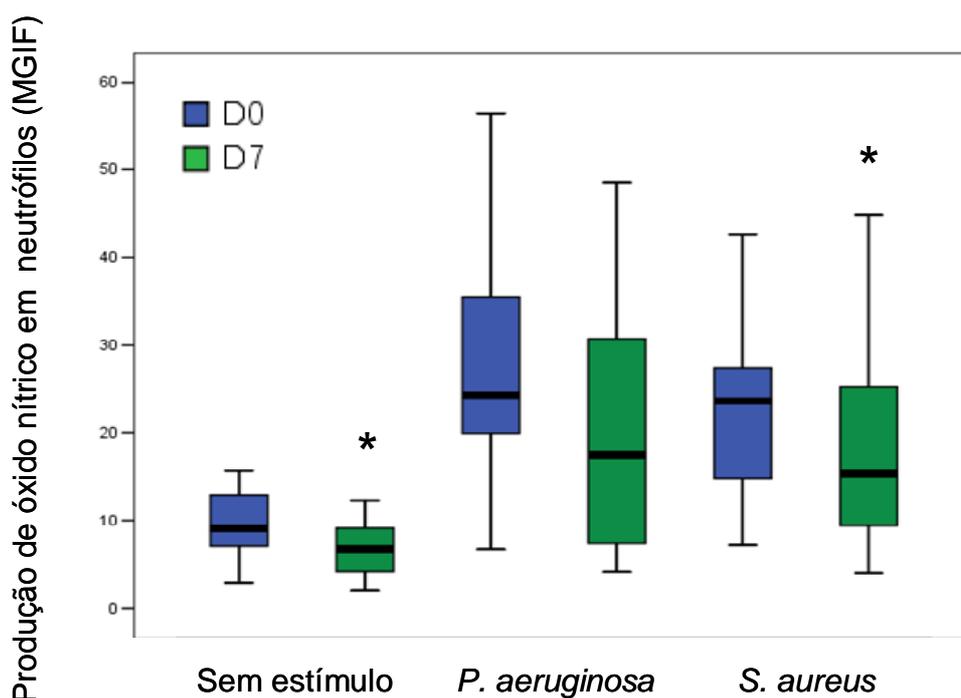


Figura 24: Produção de óxido nítrico em neutrófilos de 29 pacientes sépticos nas coletas do D0 e D7 em diferentes condições (Sem estímulo, estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*). Os neutrófilos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e negatividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DAF. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos. * $P < 0,05$ quando comparados os grupos D7 e D0 (Wilcoxon).

Tabela 25: Produção de óxido nítrico em neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos no D0 e D7. Os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DAF.

	Média	Desvio padrão	Mínima	Máxima
D0				
Sem estímulo	11,48	8,06	2,98	38,71
<i>P. aeruginosa</i>	27,88	15,90	6,69	67,65
<i>S. aureus</i>	23,57	14,39	7,19	75,59
D7				
Sem estímulo	7,25	4,40	2	20,7
<i>P. aeruginosa</i>	20,69	14,06	4,17	48,52
<i>S. aureus</i>	17,53	10,49	4,03	44,91

4.3.6 Análise da produção de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes na admissão e após 7 dias de seguimento em relação ao desfecho (sobrevida ou óbito) na alta hospitalar.

A produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos ao longo do seguimento se mostrou diminuída no D7 em relação ao D0 nos pacientes que sobreviveram até a alta hospitalar nas condições sem estímulo ($P < 0,002$) e estimulada com *S. aureus* ($P < 0,022$) (figura 25 e tabela 26).

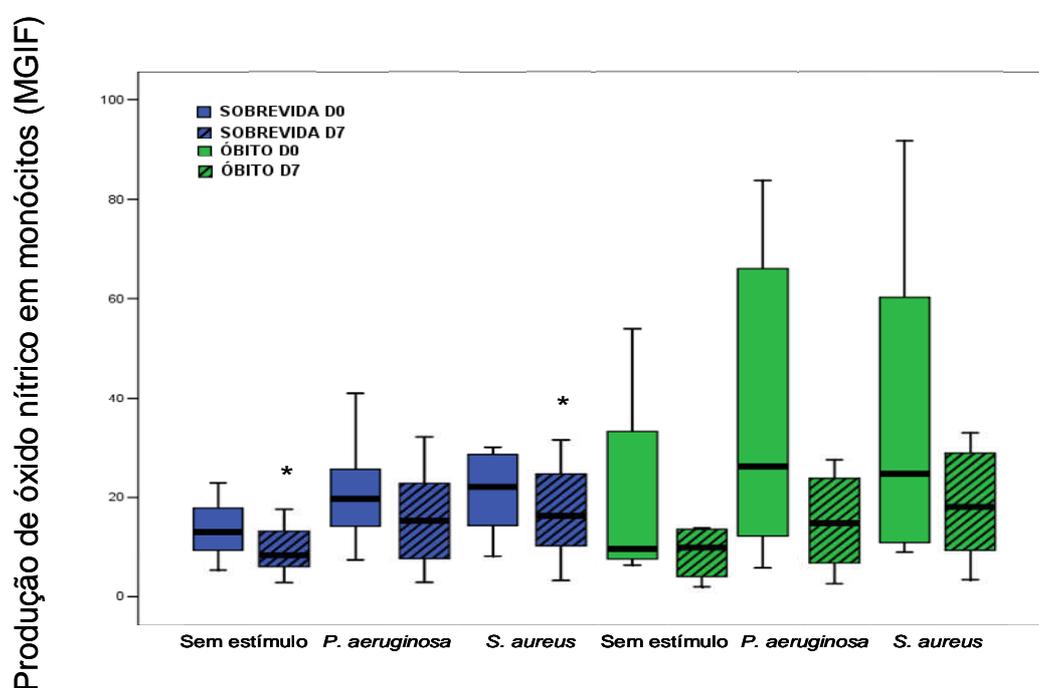


Figura 25: Produção de óxido nítrico em monócitos de 27 pacientes sépticos no seguimento (D0 e D7) em relação a mortalidade (alta hospitalar) em diferentes condições (Sem estímulo, estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*). Os monócitos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DAF. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos. * $P < 0,05$ em relação ao D0 (Wilcoxon).

Tabela 26: Produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos no seguimento (D0 e D7) em relação a mortalidade (alta hospitalar). Os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DAF.

	Média		Desvio padrão		Mínima		Máxima	
	sobrevida	óbito	sobrevida	óbito	sobrevida	óbito	sobrevida	óbito
D0								
Sem estímulo	15,81	22,17	9,88	24,18	5,45	6,50	40,83	73,02
<i>P. aeruginosa</i>	20,43	35,07	9,81	29,54	7,49	5,93	40,99	83,64
<i>S. aureus</i>	23,96	34,66	12,81	31,98	8,17	9,04	57,70	91,60
D7								
Sem estímulo	10,40	10,82	7,73	10,10	3,00	2,15	35,64	34,96
<i>P. aeruginosa</i>	20,20	14,16	17,12	9,61	3,03	2,78	66,10	27,60
<i>S. aureus</i>	18,31	18,76	11,94	11,28	3,45	3,61	53,69	33,03

Nos neutrófilos a produção de óxido nítrico também mostrou-se diminuída no D7 em relação ao D0 nos pacientes que sobreviveram até a alta hospitalar nas situações sem estímulo ($P<0,001$) e estimulado com *S. aureus* ($P<0,013$). (figura 26 e tabela 27).

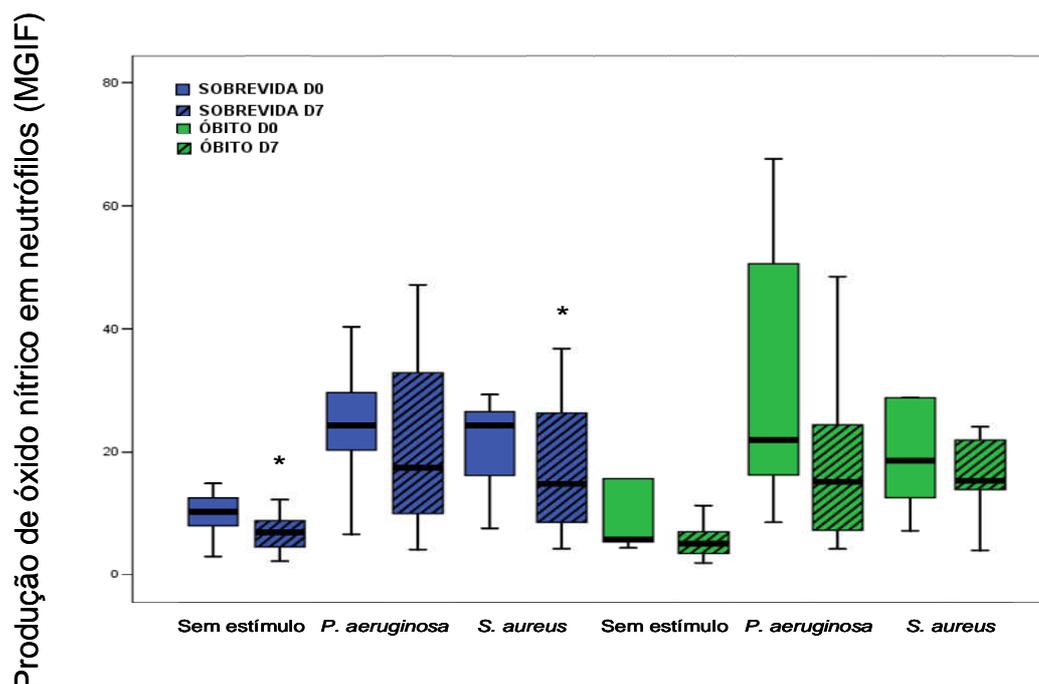


Figura 26: Produção de óxido nítrico em neutrófilos de 28 pacientes sépticos no seguimento (D0 e D7) em relação a mortalidade (alta hospitalar) em diferentes condições (Sem estímulo, estimulados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*). Os neutrófilos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e negatividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DAF. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos. * $P< 0,05$ em relação ao D0 (Wilcoxon).

Tabela 27: Produção de óxido nítrico em neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos no seguimento (D0 e D7) em relação a mortalidade (alta hospitalar). Os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DAF.

	Média		Desvio padrão		Mínima		Máxima	
	sobrevivida	óbito	sobrevivida	óbito	sobrevivida	óbito	sobrevivida	óbito
D0								
Sem estímulo	10,53	13,62	4,28	13,37	2,98	4,43	23,40	20,70
<i>P. aeruginosa</i>	24,94	33,07	11,89	22,48	6,69	8,57	56,41	47,19
<i>S. aureus</i>	21,66	27,02	8,69	23,02	7,65	7,19	42,63	36,81
D7								
Sem estímulo	7,42	6,63	4,38	4,85	2,30	2,00	38,71	17,05
<i>P. aeruginosa</i>	21,07	19,40	14,32	15,05	4,17	4,26	67,65	48,52
<i>S. aureus</i>	17,00	17,81	10,15	12,06	4,32	4,03	75,59	44,91

Discussão

5. DISCUSSÃO

A produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico foi avaliada em pacientes com sepse no dia zero e após sete dias de tratamento. Esta mensuração foi realizada em monócitos e neutrófilos do sangue periférico no estado basal e após estímulos com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Os monócitos e neutrófilos de pacientes sépticos apresentaram maior produção de EROs comparados a indivíduos saudáveis à admissão no estudo (dia 0) em todas as situações avaliadas.

Nas amostras do dia 0, não observamos diferença na produção de EROs por monócitos e neutrófilos entre pacientes com sepse grave e choque séptico. Não houve correlação entre geração de EROs na admissão com idade, gênero, escores APACHEII e SOFA dos pacientes estudados, assim como não houve associação com o desfecho clínico.

Os resultados obtidos no dia da admissão nessa coorte de pacientes são similares aos anteriormente obtidos por nosso grupo em duas coortes de pacientes sépticos, onde a geração de EROS em pacientes foi maior que nos controles saudáveis (Martins *et al.*, 2003 e 2008). Estão também de acordo com outros apresentados na literatura, como por exemplo, de Kaufmann *et al.* que encontraram aumento da produção espontânea de peróxido de hidrogênio em neutrófilos de pacientes com choque séptico comparado a indivíduos saudáveis ou pacientes com sepse (Kaufmann *et al.*, 2006). Wittmann *et al.* mostraram que neutrófilos de pacientes sépticos com síndrome de disfunção de órgãos apresentaram maior produção de EROs que indivíduos saudáveis (Wittmann *et al.*, 2004).

Em estudos prévios de nosso grupo, foi demonstrado que monócitos de pacientes com sepse grave e choque séptico apresentam diminuição da produção de citocinas inflamatórias (Brunialti *et al.*, 2006), em contraste com preservada ou aumentada produção de EROs (Martins *et al.*, 2008). Nossos resultados corroboram a preservação da capacidade dos monócitos de indivíduos sépticos de gerarem espécies reativas de oxigênio e reforçam a idéia de que há uma reprogramação da função celular de monócitos em pacientes sépticos. Essa dicotomia, inibição de citocinas inflamatórias e preservação de geração de EROs, foi observada em modelos experimentais de sepse (Barbeiro *et al.*, 2009) e na indução de tolerância ao LPS de células do sangue periférico de voluntários sadios (Fernandes *et al.*, 2010). Foi demonstrado que peptídios antimicrobianos inibiam a produção de TNF e óxido nítrico em macrófagos humanos e murinos induzidos por endotoxina, mas em contraste a pré-incubação com esses peptídios e endotoxinas levava a um aumento do “burst” respiratório (Zughaier. *et al.*, 2005).

A produção de EROs foi avaliada anteriormente em pacientes com sepse, sepse grave e choque séptico, encontrando-se aumentada em todos os estádios em comparação com o indivíduo sadio (Martins *et al.*, 2008). Nos pacientes com sepse grave e choque séptico ela foi maior naqueles que obtiveram escore de SOFA maior que 7 (ponto de discriminação entre sobreviventes e não sobreviventes do grupo estudado).

Deve-se ressaltar, no entanto, que os estudos anteriores avaliando produção de EROs foram baseados em amostras de corte e não em amostras de seguimento de um mesmo indivíduo.

Nesse estudo, os pacientes foram acompanhados realizando-se uma coleta de seguimento, 7 dias após a primeira. Os monócitos dos pacientes apresentaram diminuição da produção de EROs no dia 7 em relação ao dia 0 em todas as situações analisadas, enquanto essa diminuição nos neutrófilos ocorreu somente na situação estimulada com *S. aureus*.

Foi avaliada a relação entre a geração de EROs medida nas amostras do D0 e D7 com o desfecho clínico dos pacientes, alta hospitalar ou óbito. Não se observou diferença na produção de EROs por monócitos e neutrófilos na admissão entre os pacientes que sobreviveram e os que evoluíram para o óbito. Entretanto, quando avaliamos essa produção na admissão e após 7 dias de seguimento, observamos que os pacientes que sobreviveram na alta hospitalar apresentaram diminuição de EROs por monócitos no dia 7 em relação ao dia 0 em todas as situações analisadas e por neutrófilos quando estimulados com *P. aeruginosa* e *S. aureus*. O presente estudo confirma e expande achados anteriores ao acrescentar a avaliação da produção de EROs em amostras de seguimento de um mesmo indivíduo, demonstrando que esta resposta é maior no paciente no início da sepse e que tende a decair após 7 dias. Além disso, os resultados aqui apresentados indicam que a persistência no aumento dessa resposta tem implicações na sobrevida do paciente, uma vez que os pacientes que sobreviveram foram os que tiveram diminuição dessa produção após sete dias de tratamento.

O reconhecimento de componentes bacterianos por fagócitos é seguido de produção de mediadores inflamatórios e recrutamento de células imunes. Uma vez ativado os fagócitos produzem e armazenam uma série de agentes microbicidas. A resposta imediata a esse reconhecimento é crucial para a

defesa do indivíduo e o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio no momento inicial da sepse contribui para erradicação do patógeno no foco infeccioso. Esta resposta imediata aos patógenos invasores é seguida de uma regulada ação de reparo aos danos causados ao hospedeiro, entretanto a perda da regulação desta resposta pode ter efeitos danosos sobre vasos e tecidos podendo levar a disfunção de órgãos (Castellheim *et al.*; 2009, Cepinskas e Wilson, 2008; Van Amersfoort *et al.*, 2003).

Além da geração de EROs, a produção de NO pelas células inflamatórias representa um importante mecanismo de defesa do hospedeiro, quer pelos efeitos microbicidas quer pelos efeitos de sinalização celular. Ainda, de forma semelhante às EROs, a produção de NO é um mecanismo de defesa, mas pode ser deletéria ao hospedeiro, estando relacionada a diversos eventos fisiopatológicos da sepse (Cepinskas e Wilson, 2008).

Quando comparado aos indivíduos sadios os monócitos dos pacientes sépticos apresentaram maior produção de NO em todas as situações avaliadas, e, nos neutrófilos, a produção se mostrou aumentada na situação basal.

Semelhantemente aos resultados da produção de EROs, nas amostras do dia 0 não observamos diferença na produção de NO por monócitos e neutrófilos entre pacientes com sepse grave e choque séptico. Não houve correlação entre a produção de NO na admissão com idade, gênero, escores de APACHE II e SOFA dos pacientes estudados, assim como não houve associação com o desfecho clínico.

Aumento do óxido nítrico e peroxinitrito foi observado no miocárdio de ratos tratados intraperitonealmente com LPS de *Salmonella typhosa* comparados

com controles (salina), demonstrando que o aumento da geração de NO, superóxido e assim peroxinitrito ocorre na disfunção cardíaca de ratos após endotoxemia (Khadour *et al.*, 2002). De Werra *et al.* encontraram valores aumentados de nitrito e nitrato no plasma de pacientes com choque séptico comparado a pacientes com choque cardiogênico e pneumonia bacteriana, concluindo que os valores de metabólitos do óxido nítrico seria um teste satisfatório para definir pacientes com choque séptico (de Werra *et al.*, 1997).

Em relação às coletas de seguimento (dias 0 e 7) a produção de NO se mostrou diminuída em monócitos no D7 em relação ao D0 na situação basal. Os neutrófilos apresentaram diminuição de NO no D7 em relação ao D0 nas situações sem estímulo e estimulados com *S. aureus*.

Os resultados obtidos no presente estudo reforçam a importância do aumento da produção de moléculas microbidas, como NO e EROs, no momento inicial da sepse e que no decorrer das manifestações clínicas as células tendem a sofrer uma reprogramação com intuito de promover uma homeostase no organismo. Em estudo realizado por nosso grupo, foi demonstrada uma regulação negativa da produção de citocinas inflamatórias nos pacientes com sepse grave e choque séptico quando comparados a sepse e a voluntários sadios, evidenciando que a resposta inflamatória está associada ao *continuum* das manifestações clínicas da sepse, com uma forte resposta inflamatória na fase inicial (sepse) e um quadro refratário nas fases tardias (sepse grave e choque séptico) (Brunialti *et al.*, 2006).

Assim como ocorreu com a produção de EROs não encontramos associação da produção de NO com desfecho clínico nas coletas de admissão. Todavia, quando avaliamos a produção de NO no seguimento em relação ao

desfecho clínico dos pacientes na alta hospitalar (mortalidade ou sobrevida), os monócitos e neutrófilos dos pacientes que sobreviveram apresentaram uma diminuição de NO no dia 7 em relação ao dia 0 nas situações sem estímulo e estimulado com *S. aureus*. Essa dinâmica indica que a persistência da produção desse mediador pode ter consequências negativas na sobrevida do paciente com sepse. Muitas explicações podem ser utilizadas para tal fenômeno, pois o aumento deste mediador tem sido relatado, por exemplo, como responsável pela vasodilatação excessiva e pela hiporresponsividade vascular que ocorre durante a sepse (Fernandes e Assreuy, 2008). A ação do NO na falha da migração de neutrófilos também poderia estar relacionada a sobrevida destes pacientes. Um estudo experimental demonstrou que apesar da importância do NO na atividade microbicida dos neutrófilos, sua geração na sepse grave reduz a migração, rolagem e adesão destas células, prejudicando sua migração para o foco infeccioso (Benjamim *et al.*, 2002).

Outra hipótese para explicar nossos achados seria que o NO pode reagir com ânion superóxido levando a produção de peroxinitrito. Szabó *et al.*, demonstraram que o peroxinitrito promoveu quebra de DNA em cultura de macrófagos e células de músculo liso. A quebra de DNA promovida pela ação do peroxinitrito pode levar a disfunção e morte da célula (Szabó *et al.*, 1996; Szabó, 2005).

O presente estudo é o primeiro relato da produção de NO na sepse mensurada diretamente no interior de células. Além disso, com intuito de obter resultados que retratassem o que ocorre no corpo humano, a análise foi realizada em sangue total, propiciando interação entre as células e diversos componentes humorais e celulares. (Freudenberg & Galanos, 1992).

Conclusões

6. CONCLUSÕES

A produção de EROs e de NO está aumentada nos pacientes sépticos quando comparados aos indivíduos saudáveis na situação basal e quando sob estímulos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Esses dados mostram que a reprogramação celular que ocorre na sepse preserva a capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, mesmo em estágios avançados como sepse grave e choque séptico.

A produção de EROs e NO em monócitos e neutrófilos no D0 não apresentou correlação com idade, gênero e os escores APACHE II e SOFA. Não houve diferença na produção de EROs e NO entre pacientes com sepse grave e choque séptico. Também não houve diferença na produção de EROs e NO entre pacientes que sobreviveram e que evoluíram para óbito no D0. Esses dados mostram que ambas as produções não são marcadores sensíveis e específicos para prever disfunção orgânica e mortalidade no D0.

A produção de EROs e NO foi menor no D7 quando comparado ao D0, evidenciando uma modulação celular dos pacientes após sete dias de tratamento.

A produção de EROs e NO foi menor após sete dias de seguimento nos pacientes que sobreviveram (alta hospitalar) e manteve-se nos mesmos patamares nos pacientes que evoluíram para óbito. Esses dados sugerem que o aumento da produção de EROs e NO no início da sepse contribuiu para uma resposta eficaz do hospedeiro para erradicação do patógeno do organismo, mas que a persistência exacerbada desses mediadores pode ter impacto negativo na sobrevivência do paciente com sepse.

Ameros

7. ANEXOS

Anexo 1: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO EM MONÓCITOS E NEUTRÓFILOS DO SANGUE PERIFÉRICO DURANTE O CONTINUUM DA SEPSE E SUA CORRELAÇÃO COM A DISFUNÇÃO DE ÓRGÃOS

Pesquisadores responsáveis:

Sidnéia da Silva Sousa

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 sepsis.

Basicamente, os objetivos desse estudo são:

1. Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico durante o continuum da sepsis em um mesmo indivíduo.

2. Correlacionar a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico com a disfunção de órgãos.

COLETA DE SANGUE: será coletada amostra de 5mL de sangue em tubo a vácuo contendo ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) de 50 pacientes sépticos vinte e cinco 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 I - 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 DESTES 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: Sidnéia da Silva Sousa que pode ser encontrada no Laboratório de Virologia e Imunologia I, sito à Rua Pedro de Toledo, 781 - 150 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 o estudo: **AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO EM MONÓCITOS E NEUTRÓFILOS DO SANGUE PERIFÉRICO DURANTE O CONTINUUM DA SEPSE E SUA CORRELAÇÃO COM A DISFUNÇÃO DE ÓRGÃOS.**

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

Anexo 2: Aprovação do Comitê de ética em pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO/HOSPITAL SÃO PAULO

Data: 15-07-2010 13:46:39

Página 1/2

id = 579

São Paulo, 24 de Abril de 2009

CEP 0346/09

Ilmo(s). Sr(a).

Pesquisador(a) Sidneia da Silva Sousa

Co-Investigadores: Sidneia da Silva Sousa ; Milena Karina Coló Brunialti; Flávia Ribeiro Machado; Otelo Rigato Junior; Eliezer Silva;

Reinaldo Salomão;

Disciplina/Departamento Infectologia da

Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador Este projeto está contido no Projeto Temático:

CARTA DE APROVAÇÃO E PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado:

'Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico durante o continuum da sepse e sua correlação com a disfunção de órgãos.

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

CARACTERÍSTICA DO ESTUDO: Estudo coorte

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

OBJETIVOS: Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico durante o continuum da sepse em um mesmo indivíduo e correlacionar com a disfunção de órgãos

RESUMO: Voluntários saudáveis e pacientes sépticos serão recrutados no Hospital São Paulo, Hospital Santa Marcelina, Hospital Albert Einstein e Hospital Sírio Libanês. Serão coletados 10 mL de sangue de 50 pacientes em sepse e 20 destes pacientes serão seguidos para obtenção de amostras após 7, 14 e 28 dias ou alta hospitalar. Serão coletadas amostras de 25 voluntários saudáveis. As amostras serão processadas em até 6 horas no Laboratório de Imunologia I da Disciplina de Infectologia da UNIFESP. Será realizado ensaio de metabolismo oxidativo de neutrófilos e monócitos por citometria de fluxo, realizada estimulação *in vitro* de sangue total para estudo da produção de óxido nítrico e ensaios de detecção da produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio.

FUNDAMENTAÇÃO RACIONAL: Este estudo visa observar a associação do estado de ativação dos neutrófilos e monócitos à disfunção de órgãos e mortalidade na sepse grave e no choque séptico. Dados sugerem que nas fases iniciais da sepse a elevada produção de EROs pode ter um papel protetor, restringindo o foco infeccioso, e nas fases mais tardias, um efeito deletério, associado à disfunção orgânica.

MATERIAL E METODO: Estão descritos os procedimentos a serem realizados. Este projeto está inserido no projeto temático multicêntrico, apresentando aprovação dos CEPs dos Hospitais São Paulo, Albert Einstein e Sírio Libanês.

TCLE: Adequado

DETALHAMENTO FINANCEIRA: FAPESP - R\$ 3289,20

CRONOGRAMA: 24 meses

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado

PRIMEIRO RELATÓRIO PREVISTO PARA: 29/04/2010, os demais relatórios deverão ser entregues ao CEP anualmente até o término 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

Bibliografia

7. BIBLIOGRAFIA

Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res.* 1999 Aug 15;43(3):521-31.

Babior BM. The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest.* 1984 Mar;73(3):599-601. Review.

Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 1999 Mar 1;93(5):1464-76.

Baumgart K, Radermacher P, Wagner F. Applying gases for microcirculatory and cellular oxygenation in sepsis: effects of nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2009 Apr;22(2):168-76.

Barbeiro HV, Barbeiro DF, Debbas V, Souza HP, Laurindo FR, Velasco IT and Soriano FG. Purine nucleotides reduce superoxide production by nitric oxide synthase in a murine sepsis model. *Braz J Med Biol Res*, November 2009, Volume 42(11)1050-1057.

Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol.* 2004 Feb;40(12):845-59.

Benjamim CF, Silva JS, Fortes ZB, Oliveira MA, Ferreira SH, Cunha FQ. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect Immun.* 2002 Jul;70(7):3602-10.

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

Brunialti MK, Martins PS, Barbosa de Carvalho H, Machado FR, Barbosa LM, Salomao 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.

Castellheim A, Brekke OL, Espevik T, Harboe M, Mollnes TE. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scand J Immunol.* 2009 Jun;69(6):479-91.

Cauwels A. Nitric oxide in shock. *Kidney Int.* 2007 Sep;72(5):557-65.

Cepinskas G, Wilson JX. Inflammatory response in microvascular endothelium in sepsis: role of oxidants. *J Clin Biochem Nutr.* 2008 May;42(3):175-84.

de Werra I, Jaccard C, Corradin SB, Chioléro R, Yersin B, Gallati H, Assicot M, Bohuon C, Baumgartner JD, Glauser MP, Heumann D. Cytokines, nitrite/nitrate, soluble tumor necrosis factor receptors, and procalcitonin concentrations: comparisons in patients with septic shock, cardiogenic shock, and bacterial pneumonia. *Crit Care Med.* 1997 Apr;25(4):607-13.

Dusse L MS, Vieira LM, Carvalho das Graças M. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* v. 39, n. 4, 2003.

Fernandes D, Assreuy J. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. *Shock*. 2008 Oct;30 Suppl 1:10-3.

Fernandes ML, Mendes ME, Brunialti MK, Salomão R. Human monocytes tolerant to LPS retain the ability to phagocytose bacteria and generate reactive oxygen species. *Braz J Med Biol Res*. 2010 Aug 20 (*in press*).

Flora Filho R and Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. metabolismo, síntese e funções. *Rev. Assoc. Med. Bras*. 2000, vol.46, n.3, pp. 265-271.

Freudenberg MA, Galanos C. Metabolism of LPS in vivo. In *Bacterial endotoxins lipopolysaccharides*, J.L.Ryan, D.C. Morrison, eds (Boca Raton: CRC Press), pp. 275-94, 1992.

Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev*. 1998 Mar;17(1):7-23.

Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001 Feb;280(2):F193-206.

Henkin CS, Coelho JC, Paganella MC, de Siqueira RM, Dias FS. Sepsis: uma visão atual. *Sci. Med*. 2009 Sep 19(3):135-145.

Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):971-4.

Hollenberg SM, Guglielmi M, Parrillo JE. Discordance between microvascular permeability and leukocyte dynamics in septic inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Crit Care*. 2007;11(6):R125.

Huet O, Obata R, Aubron C, Spraul-Davit A, Charpentier J, Laplace C, Nguyen-Khoa T, Conti M, Vicaut E, Mira JP, Duranteau J. Plasma-induced endothelial oxidative stress is related to the severity of septic shock. *Crit Care Med*. 2007 Mar;35(3):821-6.

Kaufmann I, Hoelzl A, Schliephake F, Hummel T, Chouker A, Peter K, Thiel M. Polymorphonuclear leukocyte dysfunction syndrome in patients with increasing sepsis severity. *Shock*. 2006 Sep;26(3):254-61.

Khadour FH, Panas D, Ferdinandy P, Schulze C, Csont T, Lalu MM, Wildhirt SM, Schulz R. Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Sep;283(3):H1108-15.

Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Higuchi T, Hirata Y, Nagano T. Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1999 Nov 2;38(21):3209-3212.

Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med.* 2010 Feb;38(2 Suppl):S26-34.

López A, Lorente JA, Steingrub J, Bakker J, McLuckie A, Willatts S, Brockway M, Anzueto A, Holzapfel L, Breen D, Silverman MS, Takala J, Donaldson J, Arneson C, Grove G, Grossman S, Grover R. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 2004 Jan;32(1):21-30.

Magder S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care.* 2006 Feb;10(1):208-15.

Martins PS, Kallas EG, Neto MC, Dalboni MA, Blecher S, Salomão R. Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock.* 2003 Sep;20(3):208-12.

Martins PS, Brunialti MK, Martos LS, Machado FR, Assunção MS, Blecher S, Salomao R. Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis. *Crit Care.* 2008;12(1):R25.

Nguyen HB, Rivers EP, Abrahamian FM, Moran GJ, Abraham E, Trzeciak S, Huang DT, Osborn T, Stevens D, Talan DA. Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines. *Ann Emerg Med.* 2006 Jul;48(1):28-54. Epub 2006 May 2.

Ochoa JB, Udekwu AO, Billiar TR, Curran RD, Cerra FB, Simmons RL, Peitzman AB. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg.* 1991 Nov;214(5):621-6.

Orrenius S. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev.* 2007;39(2-3):443-55.

Remick DG. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol.* 2007 Sep;171(3). Review.

Ribeiro SMR, Queiroz JH, Pelúzio MCG, Costa NMB, Matta SLP, Queiroz MELR. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Biosci. j;*21(3):133-149, set.-dez. 2005.

Rigato O, Silva E, Salomao R. Pathogenesis-oriented targets for adjunctive therapy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2006 Jun;6(2):193-200.

Segal, A. W. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23: 197-223, 2005.

Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assunção M, Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Corrêa AD, Vieira PC,

Knobel E; Brazilian Sepsis Epidemiological Study. Crit Care. 2004 Aug;8(4):R251-60.

Spiller S, Elson G, Ferstl R, Dreher S, Mueller T, Freudenberg M, Daubeuf B, Wagner H, Kirschning CJ. TLR4-induced IFN-gamma production increases TLR2 sensitivity and drives Gram-negative sepsis in mice. J Exp Med. 2008 Sep 1;205(9):2177.

Sogayar AM, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grion CM, Lobo SM, Tura BR, Silva CL, Cal RG, Beer I, Michels V, Safi J, Kayath M, Silva E; Costs Study Group - Latin American Sepsis Institute. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. Pharmacoeconomics. 2008;26(5):425-34.

Szabó C, Zingarelli B, O'Connor M, and Salzman AL. DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 March 5; 93(5): 1753–1758.

Szabó C. Poly(ADP-ribose) polymerase activation by reactive nitrogen species--relevance for the pathogenesis of inflammation. Nitric Oxide. 2005 Mar;14(2):169-79. Epub 2005 Aug 18.

Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. Semin Immunol. 2004 Feb;16(1):3-9.

Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. Clin Microbiol Rev. 2003 Jul;16(3):379-414.

Vlessis AA, Goldman RK, Trunkey DD. New concepts in the pathophysiology of oxygen metabolism during sepsis. Br J Surg. 1995 Jul;82(7):870-6.

Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. Lab Invest. 2000 May;80(5):617-53.

Wittmann S, Rothe G, Schmitz G, Fröhlich D. Cytokine upregulation of surface antigens correlates to the priming of the neutrophil oxidative burst response. Cytometry A. 2004 Jan;57(1):53-62.

Zughaier SM, Shafer WM, Stephens DS. Antimicrobial peptides and endotoxin inhibit cytokine and nitric oxide release but amplify respiratory burst response in human and murine macrophages. Cell Microbiol. 2005 Sep;7(9):1251-62.

ABSTRACT

The innate immune system is the first line of defense against infections. The eradication of invading microorganisms by neutrophils, monocytes and macrophages depends largely on the phagocytic ability and subsequent generation of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO). This study evaluates the production of ROS and NO by monocytes and peripheral blood mononuclear cells, during the treatment of sepsis. Blood samples from 50 septic patients, in which the event of sepsis was diagnosed until 48 hours, was collected as day zero (D0) and a second sample from 30 of these patients was collected seven days (D7) after the defining event of sepsis. The production of ROS and NO was measured by flow cytometry, using DCFH-DA and DAF-FM-DA as substrates, respectively. Data were acquired and analyzed using CellQuest software. Spontaneous production of ROS as well ROS generation after stimulation with *S. aureus* and *P. aeruginosa* was observed. The production of ROS by monocytes and neutrophils on D0 was higher in septic patients when compared to the healthy controls in three situations: without stimulation, stimulated with *P. aeruginosa* and stimulated with *S. aureus*. This production was not correlated with age, gender, APACHE II and SOFA scores. There were no differences in ROS and NO production among patients with severe sepsis and septic shock. Also, there were no differences in ROS production between survivors and patients who died. Comparative production of ROS on D7 in relation to D0 demonstrated a decrease in the ROS production by monocytes of septic patients, in the three conditions evaluated. When the same analysis was run to neutrophils, a decrease in ROS production was observed in D7 when cells were stimulated with *S. aureus*. Monocytes of patients who survived showed a decrease in ROS production on D7 compared to D0 in all situations evaluated. This decrease occurred in neutrophils stimulated with *P. aeruginosa* and *S. aureus*. NO production in monocytes on D0 was higher in septic patients compared to the healthy controls in three situations evaluated: without stimulation, stimulated with *P. aeruginosa* and *S. aureus*. A decrease in NO production in neutrophils occurred only when cells were not stimulated. NO production in monocytes and neutrophils in the D0 did not correlate with age, gender, APACHE II and SOFA. There was no difference in NO production among patients with severe sepsis and septic shock. There was also no difference in NO production among patients who survived and who died on D0. The production of NO on D7 increased significantly when compared to D0 in monocytes without stimulation. In neutrophils this increase in the production occurred in the conditions without stimulation and when cells were stimulated with *S. aureus*. A decrease of NO production in D7 in relation to D0 by monocytes and neutrophils without stimulation and stimulated with *S. aureus* was observed in those patients who survived when compared to those who died. The increased production of ROS and NO in early sepsis may be contributing to an effective response of the host in an attempt to eradicate the pathogen, however the persistence of these mediators may contribute to exacerbate the negative impact on survival of patients with sepsis.

Sousa, Sidnéia da Silva

Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos e a sua correlação com desfecho clínico /Sidnéia da Silva Sousa. São Paulo, 2010.

xv, 72f.

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

Título em inglês: Evaluation of the production of species reactivates of oxygen and oxide nítrico in monocytes and neutrophils of the outlying blood of patient septic and his correlation with clinical ending.

1. Espécies de reativas oxigênio 2. Óxido nítrico 3. Monócitos 4. Neutrófilos
5. Citometria de fluxo.

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](#)