UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL

Mario Castro Alvarez Perez

EPIDEMIOLOGIA, DIAGNÓSTICO, MARCADORES DE IMUNOCOMPETÊNCIA E PROGNÓSTICO DA SEPSE

RIO DE JANEIRO
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Mario Castro Alvarez Perez

EPIDEMIOLOGIA, DIAGNÓSTICO, MARCADORES DE IMUNOCOMPETÊNCIA E PROGNÓSTICO DA SEPSE

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Fisiopatologia Clínica e Experimental – FISCLINEX – da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. José Hermógenes Rocco Suassuna

Rio de Janeiro
2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A473 Alvarez Perez, Mario Castro.

Epidemiologia, diagnóstico, marcadores de imunocompetência e prognóstico da sepse / Mario Castro Alvarez Perez. – 2009.

xii, 106 f. : il.

Orientador : José Hermógenes Rocco Suassuna

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-Graduação em Fisiologia e Fisiopatologia Clínica e Experimental.

Bibliografia : f. 88-98.

1. Sepse – Teses. 2. Epidemiologia – Teses. 3. Sistema imune – Teses. 4. Envelhecimento – Teses. 5. Receptores de IgG – Teses. 6. Antígenos HLA-DR – Teses. I. Suassuna, José Hermógenes Rocco. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.94-036.22

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

_____ _____

Assinatura Data

Mario Castro Alvarez Perez

Epidemiologia, diagnóstico, marcadores de imunocompetência e prognóstico da Sepse

Tese apresentada, como requisito para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Fisiopatologia Clínica e Experimental – FISCLINEX – da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovado em _____

Banca Examinadora: _____

_____
Prof. Dr. José Hermógenes Rocco Suassuna (Orientador)
Faculdade de Medicina da UERJ

_____
Prof. Dr. Sérgio da Cunha
Faculdade de Medicina da UERJ

_____
Prof. Dr. Roberto Alves Lourenço
Faculdade de Medicina da UERJ

_____
Prof. Dr. Rodrigo Siqueira-Batista
Faculdade de Medicina de Teresópolis – UNIFESO

_____
Prof. Dr. Cid Marcos David
Faculdade de Medicina da UFRJ

Rio de Janeiro
2009

DEDICATÓRIA

A DEUS, origem da vida e existência de tudo que é perceptível (ou não). Mais do que dogma ou fé, uma certeza. Gratidão e amor!

Aos meus doces e amados filhos, minha mais pura e sincera devoção. Seus olhinhos iluminados inúmeras vezes representaram a diferença entre prosseguir e desistir, viver ou sofrer. Amor inigualável!

A Rosane, pela dedicação, apoio constante e resgate de uma mente que se perdia há duas décadas. Sem você, nada teria sido possível!

A meus pais, que me conduziram pela existência. Um maravilhoso homem (*in memorian*), que fez da arte de curar um exercício de semi-santidade e um exemplo de dignidade; uma doce mulher que fez do inesgotável amor à família seu princípio básico de vida.

A meu irmão, companheiro contínuo de jornadas e desafios, mas também de desabafos.

A meus alunos queridos, minha maior fonte de inspiração para o exercício da Medicina e da Docência.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Hermógenes Rocco Suassuna – orientador competente, pesquisador consagrado e um obstinado pela grandeza do saber. Suas orientações foram um contínuo inesgotável na busca da perfeição.

Ao Prof. Dr. Emílio Antônio Francischetti – pela confiança, carinho e apoio. Foi a porta que se abriu para um paraíso ainda mais deslumbrante e maravilhoso, quando outra, mais próxima e supostamente de mais fácil transposição, incompreensivelmente se fechava.

Ao Prof. Dr. Mario Fritsch Tóros Neves – pela amizade e apoio acadêmico que já dura décadas.

Aos colegas docentes e médicos do Hospital Universitário Pedro Ernesto – pelo apoio na realização de significativas etapas da presente jornada.

À Profª. Drª. Maria Tereza Aquino – dívida e gratidão eternas.

À Rede Rio de Medicina, na pessoa de seus patronos (família Zaide) – pela confiança demonstrada em todos os momentos, e pelo suporte na viabilização do presente estudo.

Aos Professores Sávio Santos e Loriléa Chaves pelo constante carinho, apoio e amizade, além da magnífica oportunidade de compartilharmos o maravilhoso prazer da docência.

Aos colegas docentes e médicos do Hospital Universitário Pedro Ernesto pelo apoio na realização da presente jornada, seja na contribuição ativa em alguma etapa do projeto, seja na compreensão da indispensável necessidade de minha ausência.

A todos cujo sorriso sincero revelou a mais pura confiança e o mais singelo voto de sucesso na presente empreitada.

Há, verdadeiramente, duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe.
A ciência consiste em saber; em crer que se sabe está a ignorância.
Hipócrates

Avalia-se a inteligência de um indivíduo pela quantidade
de incertezas que ele é capaz de suportar.
Immanuel Kant

O importante é não parar de questionar. A curiosidade
tem a sua própria justificativa racional para existir...
Não perca nunca essa sacrossanta curiosidade.
Albert Einstein

O professor medíocre expõe. O bom professor explica. O professor
superior demonstra. O grande professor inspira.
William Arthur Ward

RESUMO

ALVAREZ-PEREZ, Mario Castro. *Epidemiologia, Diagnóstico, Marcadores de Imunocompetência e Prognóstico da Sepse*. XXX f. Tese (Doutorado em Medicina) – Programa de Fisiologia e Fisiopatologia Clínica e Experimental/CLINEX, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Apesar de uma diversidade de estudos científicos, em que dezenas de milhares de pacientes foram analisados e tratados, a sepse continua sendo um grande desafio para a medicina contemporânea. Investigações bem conduzidas levaram a uma reavaliação do modelo clássico da sepse, tradicionalmente vista como um processo descontrolado de hiperinflamação sistêmica, uma vez que observou-se a existência de uma atividade antiinflamatória ao longo do seu curso evolutivo. Nesse contexto, o comportamento do sistema imune inato se assemelha ao de indivíduos idosos submetidos ao fenômeno da imunossenescência, interseção ainda mais relevante ao considerarmos o crescente incremento na faixa etária média dos pacientes internados em UTI. O presente estudo visou a estabelecer a epidemiologia da sepse em um hospital público de um país de renda media, como é o caso do Brasil. Ademais, através de citometria de fluxo, buscamos definir a cinética da expressão monocitária de moléculas HLA-DR e CD64 ao longo do processo de envelhecimento humano. Comparamos essas observações com o comprometimento do sistema imune inato visto na sepse visando discriminar as alterações da senescência do sistema imune associada ao envelhecimento daquelas associadas ao fenômeno da imunoparalisia da sepse.

Na investigação epidemiológica, nós encontramos uma taxa de ocorrência de 5,9 casos de sepse por 100 pacientes e uma densidade de incidência de 6,4 casos por 1000 pacientes-dia. Documentamos ainda sua associação com uma elevada incidência de sepse e documentamos sua associação com uma elevada taxa de comordidades crônicas. A sepse foi diagnostica tardiamente (72% dos casos após 12 horas de evolução) e em estágio avançado como atestado pleos elevados escores de gravidade de doença e de disfunção orgânica. O presente estudo identificou vários obstáculos à efetiva implementação das recomendações da *Surviving Sepsis Campaign*. No segundo estudo, observamos correlações negativas significativas entre idade e intensidade de expressão dos biomarcadores avaliados. Durante a sepse, a expressão de mHLA-DR foi ainda mais reduzida, enquanto a expressão de CD64 foi majorada. Para melhor discriminar imunossenescência de imunoparalisia, valores de *cutoff* de 9.700 m/c para mCD64 e de 7.000 m/c para mHLA-DR forneceram as melhores combinações de sensibilidade e especificidade.

Palavras-chave: Sepse. Epidemiologia. Imunossenescência. Imunoparalisia. CD64. HLA-DR.

ABSTRACT

Despite a multiplicity of trials enrolling several thousands of treated patients, sepsis still represents a major challenge to contemporary medicine. Since several well-conducted investigations have consistently indicated the existence of an anti-inflammatory activity during sepsis evolution, there has been a reappraisal of the classic sepsis model in which the condition was traditionally seen as an uncontrolled systemic hyper-inflammatory process. During sepsis, the innate immune system behavior has some similarities to the immunosenescence process experienced by elderly people; something that is even more relevant when considering the progressive increase of the mean age of the patients admitted to ICUs along the last decades. This study investigated the epidemiology of sepsis in a public university hospital from a middle-income country, as is the case of Brazil. Also, applying a flow cytometry methodology, we tried to establish the kinetics of the molecular expression of HLA-DR and CD64 on monocytes during human aging. To put it in context, we compared such findings with those obtained from septic patients aiming at the discrimination between changes related to the normal aging process from those of the immunoparalysis phenomenon seen in sepsis.

In the epidemiological arm of this study, we found an occurrence rate of 5.9 cases of sepsis per 100 patients, and an incidence density of 6.4 cases per 1000 patient-days. We documented the association of sepsis with an elevated rate of chronic comorbid conditions. Sepsis was detected late (72% evolving for more than 12 hours) and in advanced stages as indicated by severity and organ failure scores. The study detected several obstacles to the effective implementation of the Surviving Sepsis Campaign recommendations. In the second study, we observed significant negative correlations between age and the levels of HLA-DR and of CD64 expression on monocytes. During sepsis, HLA-DR expression decreased further while CD64 expression was upregulated. To better discriminate immunosenescence from immunoparalysis, cutoff values of 9,700 m/c for mCD64 and of 7,000 m/c for HLA-DR provided the best combination of sensitivity and specificity.

Key-words: Sepsis. Epidemiology. Immunosenescence. Immunoparalysis. CD64. HLA-DR

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Gráfico FSC x SSC obtido à Citometria de Fuxo.....26

Estudo 1 / *Table* 1 – Características basais dos pacientes com sepse identificados no estudo epidemiológico.....42

Estudo 1 / *Table* 2 – Características do processo infeccioso nos pacientes sépticos identificados.....42

Estudo 1 / *Figure* 1 – Resultados microbiológicos obtidos.....43

Estudo 2 / *Table* 1 – Características dos indivíduos idosos saudáveis, dos indivíduos de meia-idade e dos pacientes sépticos.....59

Estudo 2 / *Figure* 1 – *Plots* de idade *versus* expressão quantitativa de moléculas CD64 em monócitos de indivíduos saudáveis de meia-idade, idosos saudáveis e pacientes idosos sépticos.....60

Estudo 2 / *Figure* 2 – *Plots* de idade *versus* expressão quantitativa de moléculas HLA-DR em monócitos de indivíduos saudáveis de meia-idade, idosos saudáveis e pacientes idosos sépticos.....61

Estudo 2 / *Figure* 3 – Curvas ROC para melhor discriminação entre a expressão normal na superfície de monócitos de indivíduos saudáveis de meia-idade, idosos saudáveis e idosos sépticos.....62

Estudo 2 / *Figure* 4 – Curva de regressão linear da expressão molecular de HLA-DR *versus* CD64 em monócitos de indivíduos saudáveis e pacientes idosos sépticos.....63

Anexo E / Figura 1 – Gráficos produzidos pelo *software* CELLQuest à citometria de fluxo em controle idoso.....105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APACHE	*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* (escore de gravidade)
AUC	*Area under curve* (nos gráficos ROC)
CARS	Síndrome da Resposta Antiinflamatória Compensatória
ESKAPE	Acrônimo: *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*
FCM	Faculdade de Ciências Médicas da UERJ
FcγRI	Receptor do tipo I da FC de IgG (mesmo que CD64)
FOM	Falência orgânica múltipla
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
ICU	*Intensive care unit*
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IQR	Intervalo interquartil
MARS	*Mixed Antagonic Response Syndrome*
m/c	Moléculas por célula
mCD64	CD64 expresso na superfície de monócitos
MDR	*Multidrug resistant* (patógenos multi-resistentes)
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Maior
mHLA-DR	HLA-DR expresso na superfície de monócitos
MIC	*Middle-income countries*
MRSA	*Staphylococcus aureus* meticilina-resistente
ROC	Curva *receiver operating characteristics*
SAPS	*Simplified Acute Physiology Score*
SARA	Síndrome da angústia respiratória aguda
SOFA	*Sequential Organ Failure Assessment*
SSC	*Surviving Sepsis Campaign*
SIRS	*Systemic Inflammatory Response Syndrome*
TGF	*Transforming Growth Factor*
TNF	Fator de necrose tumoral
UTI	Unidade de tratamento intensivo

SUMÁRIO

I. **INTRODUÇÃO** 12
I.1 Sumário – Enfocando o Problema 12
I.2 Sepse – Definindo o Problema 14
I.3 Estágios Evolutivos da Sepse 18
I.4 Imunossenescência – Um Fenômeno Pouco Conhecido 22
I.5 Monitoração da Resposta Inflamatória 24
I.6 Citometria de Fluxo 25
I.6.1 – Fenótipo e Função das Subpopulações de Leucócitos 26
II. OBJETIVOS 28
III. **ARTIGO 1 – A prospective view of sepsis in a public academic hospital of a middle-income country: Descriptive epidemiology, timing of diagnosis, microbiology and outlook** 29
III.1 Abstract 30
III.2 Introduction 31
III.3 Materials & Methods 32
III.4 Results 34
III.5 Discussion 35
III.6 Tables and Figures 42
III.7 References 43
IV. **ARTIGO 2 – The fine line between immunosenescence and immunoparalysis: Changes in the quantitative surface expression of CD64 and HLA-DR on monocytes of healthy and septic elderly individuals** 47
IV.1 Abstract 48
IV.2 Introduction 49
IV.3 Materials & Methods 50
IV.4 Results 52
IV.5 Discussion 53
IV.6 Table and Figures 59
IV.7 References 64
V. **DISCUSSÃO** 69
VI. **CONCLUSÕES** 86
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 88
VIII. ANEXOS 99

I. INTRODUÇÃO:

I.1 Enfocando o Problema

Apesar de cerca de meio século de existência das Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) e de milhares de estudos científicos, em que dezenas de milhares de pacientes foram analisados e tratados, a sepse continua sendo um grande desafio para a medicina contemporânea. Inúmeros avanços científicos e tecnológicos têm permitido o aumento da sobrevida de pacientes portadores de doenças graves, agudas e crônicas, reduzindo a letalidade específica de tais condições, mas culminando no desfecho fatal por sepse, fruto do comprometimento da competência do sistema imune em lidar com agentes infecciosos ocasionado por tais abordagens. De outra forma, o envelhecimento da população mundial e a conseqüente sobreposição de comorbidades têm conduzido a um cenário cada vez mais rico em indivíduos com maior propensão às doenças infecciosas. Assim, compreender os domínios da sepse no ser humano, incluindo indivíduos nos extremos mais elevados de idade, representa aprender a lidar com um desafio cotidiano e de incidência crescente na prática clínica.

Ao longo da última década, tem ocorrido uma reavaliação do modelo clássico da sepse, que era classicamente vista como um processo generalizado, descontrolado, de hiperinflamação sistêmica, uma vez que consistentes estudos científicos têm comprovado a existência de marcadores moleculares e celulares que indicam a presença comum de uma atividade antiinflamatória no curso da sepse (1). Assim, *pari passu* a inúmeras descobertas científicas sobre o papel de tais mecanismos moleculares e celulares na defesa do organismo – e sua tentativa de manter-se vivo por um lado e as conseqüências adversas de sua instalação, por outro – termos como CARS (síndrome da resposta antiinflamatória compensatória) e MARS (síndrome da resposta inflamatória mista antagônica) foram cunhados, passando a compor o quadro complexo dos termos e definições utilizados na sepse e demandando que novos estudos sejam realizados na busca de uma compreensão melhor dos eventos imunológicos associados (2,3).

Diversos trabalhos revelaram que um importante comprometimento da imunidade sucede a fase inflamatória inicial, fenômeno que foi denominado de imunoparalisia ou CARS (2,4). Em uma avaliação anterior, realizada no laboratório de imunopatologia (LIP) da UERJ, observou-se que a atividade de imunoparalisia pode ocorrer precocemente na evolução da sepse. Com base em técnicas quantitativas de citofluorimetria, observou-se redução na expressão de receptores

de superfície em monócitos e neutrófilos do sangue periférico, mais especificamente de antígenos MHC classe II tipo DR (HLA-DR), que ocorria paralelamente a um aumento da expressão de CD64 ($FC_{\gamma}RI$ ou receptor do tipo I para a porção Fc da imunoglobulina G), um marcador de atividade inflamatória. Tais anormalidades foram detectadas tão cedo quanto 48 horas após o diagnóstico da sepse (5).

O atual estudo visou a detectar o comportamento habitual do sistema imune dos pacientes acompanhados nas fases iniciais da sepse, correlacionando os achados encontrados com o padrão normalmente visto em indivíduos relativamente saudáveis, isto é, sem evidências claras de comprometimento do sistema imune, seja por doenças associadas a imunodeficiência seja por utilização prévia de terapias imunossupressoras.

Todavia, ao início do projeto, identificamos a inexatidão de dados relativos ao comportamento natural e habitual do sistema imune no indivíduo idoso, aspecto relevante para esta pesquisa, posto que, como já mencionado, o aumento da expectativa geral de vida da população mundial e o prolongamento da vida de indivíduos idosos, portadores de comorbidades graves e tratados com novos recursos terapêuticos, têm conduzido a um aumento da faixa etária média dos pacientes internados em UTI (6-8); em verdade, em uma proporção progressivamente crescente, a maior parte dos indivíduos internados em diversas unidades de tratamento intensivo pertence às faixas etárias dos idosos – estima-se que aproximadamente 60% dos leitos de uma UTI estão atualmente ocupados por pacientes com mais de 65 anos de idade (9).

Dada a escassez de dados na literatura médica mundial acerca do fenômeno da imunossenescência, que, resumidamente, representa o padrão natural de evolução do sistema imune durante o envelhecimento não-patológico (10), e considerando a faixa etária crescente dos pacientes admitidos nas UTIs e a relativa escassez de dados epidemiológicos consistentes sobre a sepse em nosso país – salvo os louváveis e competentes esforços dos grupos responsáveis pelos estudos BASES (11), Sepse Brasil, (12), COSTS (13) e pelos sete centros brasileiros que participaram do estudo multicêntrico PROGRESS (14) –, decidimos abordar a temática em múltiplos níveis. Inicialmente, buscamos conhecer a real epidemiologia da sepse em nosso hospital universitário (Hospital Universitário Pedro Ernesto – HUPE), realizando o inquérito epidemiológico denominado "Sepse HUPE". Em seguida, utilizando as mesmas técnicas de citofluorimetria quantitativa, analisamos a expressão molecular de antígenos HLA-DR e CD64 em monócitos do sangue periférico de idosos relativamente saudáveis, indivíduos jovens e pacientes sépticos n as primeiras horas da evolução de suas moléstias.

O presente trabalho visa a estabelecer a cinética habitual da expressão das moléculas HLA-DR e CD64 em monócitos do sangue periférico ao longo do processo de envelhecimento humano, correlacionando-a com o comprometimento do sistema imune visto na sepse e buscando apresentar uma solução para a tensão emergente em razão da detecção de alterações em pacientes sépticos idosos, onde a oposição de mecanismos causais envolvidos – imunossenescência *versus* imunoparalisia – pode interferir na correta interpretação do estado do sistema imune inato vigente na situação clínica em particular.

I.2 Sepse – Definindo o Problema

Neste início do 3º milênio, o contexto clínico-laboratorial da sepse continua sendo um dos temas mais intrigantes na prática clínica de atendimento a pacientes criticamente enfermos. Apesar de significativos avanços e progressos alcançados na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na etiopatogênese da sepse, novos conceitos têm aflorado, demandando um constante repensar no assunto e o desenvolvimento de novos estudos.

Entre os muitos avanços observados, destaca-se a identificação de uma grande variedade de mediadores inflamatórios. Com a elucidação de seus mecanismos de atuação, regulação e de suas vias de sinalização intracelular, delineou-se uma nova conceituação fisiopatológica baseada em uma intricada rede de interações moleculares e celulares. A partir de então, alguns conceitos clássicos, como o da hiper-inflamação perpetuada e crescente, têm sido colocados sob cheque, exigindo que novas teorias mais ajustadas aos recentes avanços tenham que ser elaboradas.

Muito dos conhecimentos e definições que regem os estudos sobre sepse derivam do clássico consenso da ACCP/SCCM (*American College of Chest Physicians e Society of Critical Care Medicine*) (15), que foi divulgado em 1992 e estabeleceu definições operacionais para o conjunto de anormalidades relacionadas com a sepse. A uniformização de definições e nomenclaturas permitiu que fenômenos fisiopatológicos e intervenções terapêuticas passassem a ser avaliados de forma consistente e uniforme (16). Ao final da década passada, foi possível constatar que a estratificação de grupos de pacientes mediante tais critérios possui valor prognóstico, observando-se um aumento da mortalidade diretamente relacionado ao agravamento da condição conforme a escala de gravidade implícita aos termos empregados (17,18). Mais recentemente, nova conferência de consenso patrocinada pelas mesmas sociedades médicas envolvidas no primeiro evento, dessa vez aliadas às sociedades ESICM (*European Society of Intensive Care Medicine*), ATS (*American Thoracic Society*) e SIS

(*Sepsis International Society*), revalidou a adequação da terminologia sugerida pelo consenso de 1992 (19).

Segundo os critérios ratificados, **infecção** é definida como o processo caracterizado pela existência de resposta inflamatória à presença de microorganismos ou invasão de tecidos normalmente estéreis por esses microorganismos. **Bacteremia** refere-se à presença de microorganismos viáveis no sangue (isolados em hemocultura). A **síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS)** diz respeito à disseminação sistêmica da resposta inflamatória, que, se de origem infecciosa, recebe a designação de **sepse**. A existência de **sepse** é caracterizada pela presença de uma série de variáveis clínico-laboratoriais definidas em consenso, que, além dos critérios propostos no 1º consenso, foi ampliada em 2003 com a inclusão de variáveis relacionadas à disfunção de órgãos e sistemas, à perfusão tissular (lactato e enchimento capilar periférico), à monitoração hemodinâmica invasiva (índice cardíaco e saturação venosa central de oxigênio) e a exames de laboratório (proteína C reativa titulada e procalcitonina plasmática) (19).

Sepse é diagnosticada nas situações onde existe a associação entre evidências clínicas de infecção (comprovada ou suspeita) e SIRS. O contexto de **sepse grave** corresponde a situações de sepse associadas à disfunção de órgãos, hipoperfusão tecidual ou hipotensão arterial, podendo incluir acidose lática, oligúria ou alterações do estado mental. O termo **choque séptico** aplica-se às situações de sepse com hipotensão arterial sistêmica refratária à ressuscitação volêmica e associada com anormalidades d e perfusão tissular. A situação onde a duração do choque séptico é maior do que uma hora e não responsiva à administração de líquidos e intervenção farmacológica com drogas vasopressoras é denominada de **choque séptico refratário**. Já o conceito da complicação terminal relacionada à sepse denominada **falência orgânica múltipla (FOM),** envolve a existência de disfunção orgânica cumulativa em paciente agudamente enfermo, o que demanda a instituição de intervenções específicas para manutenção da homeostasia (19).

No intuito de estadiar os pacientes sépticos, foi proposto o sistema **PIRO** – onde P = Predisposição (condição predisponente), I = Infecção (natureza e extesão do insulto), R = Resposta do organismo (natureza e magnitude da resposta do paciente) e O = disfunção Orgânica (grau de disfunção orgânica) – que se baseia no sistema TNM de classificação de tumores malignos. O sistema PIRO foi proposto para caracterizar e estadiar a resposta do paciente séptico à infecção, sugerindo áreas onde avanços científicos e tecnológicos podem ser alcançados, como na pesquisa básica sobre marcadores da competência imunológica (como a expressão de moléculas HLA-DR na superfície de células apresentadoras de antígeno) e

biomarcadores envolvidos no reconhecimento da sepse e suas implícitas, potenciais, disfunções orgânicas (19).

Sepse situa-se entre a 10ª e a 13ª causas de morte nos Estados Unidos, onde, nas duas últimas décadas, a incidência de sepse aumentou anualmente a uma taxa de 9% (20-22). Angus e colaboradores (22) estudaram 192.980 casos de sepse grave, compreendidos em uma coorte de mais de 6,5 milhões de pacientes internados em 847 hospitais em sete estados americanos e estimaram sua incidência, custo e prognóstico. A incidência de sepse grave foi de três casos por mil habitantes (751.000 casos/ano para a população americana – incidência que se tornou um parâmetro comum nos ensaios sobre sepse), superando a da AIDS e a dos principais tipos de câncer, o que resultaria em 215.000 mortes/ano (28,6% dos casos). Este valor é equivalente ao total de mortes devidas ao infarto do miocárdio (22).

Na Europa, dois grandes estudos recentes relataram um quadro similar. Num grande estudo prospectivo, Alberti *et al* (23) avaliaram 14.364 pacientes admitidos a 28 UTIs, encontrando uma incidência de infecção de 21,1% (24% com sepse severa e 30% com choque séptico); entre os pacientes com infecções nosocomiais, a taxa de letalidade foi de 53,6%. Em outro estudo, conduzido na França, Annane (24) observou uma elevada incidência de choque séptico em pacientes de terapia intensiva (8,2% dos casos), o que foi associado com uma taxa de letalidade similarmente muito significativa (60,1%).

Recentemente, quatro grandes estudos epidemiológicos descreveram as principais características da sepse no Brasil (11-14). No estudo BASES, Silva *et al* (11) avaliaram 1.383 pacientes internados em terapia intensiva agrupados de duas regiões brasileiras (sul e sudeste), encontrando uma densidade de incidência de cerca de 57 por 1.000 pacientes-dias e taxas de letalidade, entre os 884 pacientes que permaneceram internados além das primeiras 24 horas desde a admissão, variando entre 33,9 e 52,2 por cento, de acordo com o grau de severidade da sepse (de sepse sem disfunção de órgãos ao choque séptico); a taxa de sobrevida em 28 dias de todo o grupo séptico foi de 66%.

Em outro importante estudo, o Sepse Brasil, Sales Jr *et al* (12) relataram o acompanhamento de uma grande amostra de pacientes críticos (n = 3.128) até o 30º dia de *follow*-up (ou até alta ou óbito) em 75 UTIs, de cada uma das cinco regiões geográficas deste país. Todos os pacientes admitidos com sepse ou que a desenvolveram durante o período do estudo foram incluídos. Cerca de 17 por cento dos pacientes tiveram um diagnóstico de sepse, com uma taxa de letalidade global em 28 dias de 46,6% (IC95% = 42,3 – 51,0), que, estratificada por gravidade do quadro séptico, revelou-se como equivalente a 34,4% na sepse severa e 65,3% no choque séptico (12).

O estudo COSTS foi conduzido pelo Instituto Latino-Americano de Sepse (ILAS), tendo sido desenhado para avaliar prospectivamente os custos do tratamento de pacientes sépticos nas UTIs brasileiras (públicas e particulares). Nele, Sogayar *et al* (13) avaliaram custos e modelos de tratamento de pacientes sépticos admitidos em 21 UTIs nacionais. Critérios de sepse severa foram atingidos em 85 (16,2%) dos 524 pacientes avaliados; em outros 395 pacientes (75,4%), choque séptico estava presente. A taxa de letalidade global foi de 44,3%, enquanto as taxas de letalidade estratificada por tipo de UTI, pública ou privada, foram de 49,2% e 37,7%, respectivamente (13).

O estudo multicêntrico PROGRESS (14) contou com a participação de 7 UTIs brasileiras, onde foram seguidos 982 pacientes – em outros 35 países, cerca de 12.000 pacientes compuseram o restante da coorte –. O período de inclusão de casos foi de 3 anos. A mediana da idade dos pacientes sépticos atendidos nas UTIs brasileiras foi de 63 anos, similar à dos demais países (62 anos). A taxa de letalidade em nossos 7 centros foi de 56%, maior que aquela observada nos demais países – 30% em países desenvolvidos e 45% nos demais países em desenvolvimento que participaram do estudo (14).

Contudo, é digno de nota que os dados acumulados na literatura nacional são restritos a estudos feitos no ambiente das unidades de tratamento intensivo. Embora se espere que as taxas de incidência observadas sejam parecidas com aquelas relatadas em outros países, provavelmente oscilando entre 2 e 11 por cento das admissões hospitalares, e com taxas de letalidade similares às do restante do mundo (uma ampla variação, entre 20 e 80 por cento), a situação exata fora do ambiente da terapia intensiva é ainda em grande parte obscura.

Em aproximadamente 40% dos pacientes com sepse desenvolve-se choque, o que tende a agravar o prognóstico (25). Em um estudo conduzido por Bone e colaboradores (2) em 1996, observou-se mortalidade de 13% na síndrome séptica sem choque, ao passo que quando o choque estava presente no início da sepse, a mortalidade passava para 28%. Quando o choque se desenvolvia após a síndrome séptica, a letalidade atingia uma taxa de 43%.

Apesar do surgimento de novidades em termos de antibioticoterapia e tecnologia de suporte intensivo à vida, ventilação artificial e métodos de depuração extra-renal, pouco tem sido efetivamente conseguido no sentido de mudar essa realidade. Algumas terapias tidas como promissoras revelaram-se verdadeiras decepções quando aplicadas *in vivo*; um dos exemplos mais evidentes foram os ensaios clínicos com terapias dirigidas contra os mediadores inflamatórios da sepse (26) – apesar de, atualmente, com os conhecimentos adquiridos, como o conceito da imunoparalisia (CARS), termos melhores condições de entender os motivos do fracasso. – Dessa forma, a despeito dos conhecimentos fisiopatológicos adquiridos e da

inclusão de mais de 12.000 pacientes em dezenas de estudos, ao custo de bilhões de dólares, até recentemente o senso geral era que nenhuma das intervenções realizadas havia sido capaz de promover melhoras na sobrevida da sepse a patamares julgados aceitáveis, nem na redução das taxas de desenvolvimento de seqüelas mais graves como o choque séptico (26-30). Entretanto, ao longo desta década, cinco importantes ensaios clínicos randomizados, controlados, duplo-cegos – apesar de possuírem graus de evidência entre B e D – descreveram intervenções que, individualmente, produziram significativos impactos nas taxas de letalidade da sepse, trazendo-nos novas esperanças (31-35).

Assim, vive-se hoje uma era de grandes expectativas de que, em face das relevantes descobertas recentes, consigamos alcançar melhoras significativas nas inaceitáveis, elevadas taxas de letalidade da sepse. Em consonância com tal euforia, em outubro de 2002, a "Declaração de Barcelona" lançou a campanha mundial *Surviving Sepsis Campaign*, iniciativa global que visa a implementação mundial de esforços no sentido de reduzir-se a taxa de letalidade da sepse em 25% até o final da presente década (36). Sustentada na educação médica permanente, conscientização da comunidade médica acerca da necessidade do reconhecimento imediato e pronto tratamento da sepse, e na aplicação de intervenções terapêuticas (os pacotes de 6 horas e de 24 horas) consideradas, atualmente, como potencialmente capazes de reduzir o risco de desfecho letal (as 5 intervenções terapêuticas que têm sido consideradas benéficas em termos de sobrevida, numa análise baseada em evidências – (a) a ressuscitação volêmica segundo o protocolo *Early Goal Directed Therapy* (31), (b) esteróides em baixas doses no choque séptico (34), (c) Proteína C ativada recombinante humana na sepse severa (32), (d) insulinização intensiva (33) e (e) ventilação protetora na injúria pulmonar aguda/SARA (35), a *Surviving Sepsis Campaign* (36) constitui-se por si só numa prova da enorme confiança que ganhamos e mais um atestado do gênio humano e sua busca de mudanças, quando a realidade se lhe apresenta desfavorável.

I.3 – Estágios Evolutivos da Sepse

Mesmo com a descoberta de muitos dos mediadores envolvidos na sepse, ainda não é possível explicar o porquê da variação na evolução clínica de pacientes submetidos a um mesmo insulto (infeccioso ou não), nem o motivo pelo qual lesões consideradas relativamente leves em um momento inicial da doença desencadeiam graves complicações que conduzem o paciente ao óbito. Ainda é preciso entender o(s) porquê(s) de sistemas de defesa tão eficientes

desorganizarem-se a ponto de determinar uma espiral progressiva de deterioração clínica refratária às intervenções terapêuticas.

Com base na ampliação de conhecimentos sobre mediadores envolvidos na sepse, foram propostos cinco estágios de desenvolvimento na evolução dos insultos inflamatórios. O primeiro estágio corresponde à **reação local no sítio de lesão ou infecção**, que ocorre no micro-ambiente tecidual. A agressão desencadeia uma resposta inflamatória clássica, mas localizada (restrita ao local), onde citocinas, como TNF-α, IL-1β e IL-6, são liberadas com o objetivo de combater a agressão. Segue-se uma resposta antiinflamatória compensatória, que modula e limita os efeitos destrutivos do processo inflamatório. Em fase mais tardia, mediadores anti-inflamatórios como IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, receptores solúveis de TNF-α, antagonista do receptor de IL-1 e outros, ao interferirem com a função das células inflamatórias, incluindo a expressão de moléculas HLA-DR na superfície de monócitos, modulam a produção de citocinas pró-inflamatórias (37). Apesar de localmente existirem níveis significativos de citocinas, a reação tende a permanecer compartimentalizada (38,39), conforme se observa em pacientes com pneumonia lobar, onde os níveis de citocinas presentes no lavado broncoalveolar são mais elevados no lado envolvido (40).

Quando o insulto primário é mais intenso, mediadores pró-inflamatórios e, posteriormente, anti-inflamatórios "transbordam" para a circulação sistêmica, dando origem a uma **resposta sistêmica**. A presença de mediadores pró-inflamatórios circulantes deve ser vista como parte da resposta normal à infecção, sinalizando que o micro-ambiente não pôde controlar o insulto inicial e de que mais ajuda é necessária. Os mediadores pró-inflamatórios auxiliam no recrutamento local de neutrófilos, linfócitos, plaquetas e fatores de coagulação (41). O sistema imune inato encontra-se super ativado, e suas células apresentadoras de antígeno (macrófagos/monócitos e células dendríticas), através da apresentação de antígenos bacterianos ligados às moléculas MHC classe II, amplificam a resposta imune e a modulam no sentido da ativação de respostas adaptativas (42,43). Eventualmente, também estimulam uma resposta antiinflamatória sistêmica compensatória.

Em alguns pacientes, a regulação da resposta inflamatória é perdida, dando origem a uma inflamação sistêmica maciça, associada aos sinais clássicos de sepse. Ocorre disfunção endotelial progressiva, com aumento da permeabilidade micro-vascular e transudação para os órgãos (40,44). Trombos plaquetários bloqueiam a micro-circulação (45), causando má distribuição do fluxo sanguíneo e possivelmente isquemia (e injúria citopática), que pode causar lesão de reperfusão (46). O sistema de coagulação é ativado e a via da proteína C torna-se disfuncional (47). Por desequilíbrio entre mecanismos vasodilatadores e vasoconstritores,

ocorre vasodilatação intensa, que exacerba a transudação e a má distribuição do fluxo sanguíneo (48,49). Isso resulta em choque, comprometimento do fluxo sanguíneo para órgãos vitais e disfunção orgânica.

Nessa sequência de eventos, alguns pacientes com inflamação intensa morrem rapidamente com choque refratário e falência orgânica, configurando o que se convencionou chamar de "modelo de um golpe" ("*one hit*"). Muitos estudos têm mostrado que em pacientes com sepse e FOM, níveis persistentemente elevados de mediadores pró-inflamatórios estão associados com mortalidade aumentada (50-53). Em tais pacientes, a insuficiência orgânica ocorre por inflamação persistente, advindo morte caso a inflamação não possa ser sub-regulada.

Caso o paciente sobreviva à agressão inicial, mecanismos anti-inflamatórios entram em ação para controlar a inflamação. Em alguns pacientes, entretanto, a reação compensatória pode ser tão exacerbada quanto a resposta pró-inflamatória e determinar **imunossupressão excessiva,** um estado de imunodeficiência adquirida. É possível, mas não existe comprovação, que pacientes com resposta inflamatória inicial mais exuberante, estejam sujeitos a maior risco de imunodeficiência. A imunossupressão da sepse foi chamada de **imunoparalisia** por Randow e cols (4), janela de imunodeficiência por Mills e cols (54) e de síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (**CARS**) por Bone (2). Esta visão tornou-se o novo paradigma da sepse, caracterizando a mudança do modelo de hiperinflamação descontrolada para inflamação seguida de imunoparalisia.

As causas para este estado de imunossupressão ainda não foram elucidadas, mas ela se manifesta de múltiplas formas. Pacientes com sepse, geralmente apresentam monocitose, mas as células circulantes mostram-se disfuncionais (55). Observa-se diminuição persistente na expressão de antígenos HLA-DR e HLA-DQ (56), assim como capacidade diminuída para liberar espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias (37,55,57). As moléculas HLA-DR têm papel central na reposta específica à infecção, sendo essenciais para a apresentação do antígeno e a ativação de linfócitos T *helper*. Essas moléculas são expressas na superfície de células apresentadoras de antígeno, como macrófagos, células dendríticas e células B. A expressão reduzida de HLA-DR em monócitos relaciona-se com complicações infecciosas e desenvolvimento de sepse (58). A perda da expressão do antígeno MHC classe II indica que o monócito provavelmente apresenta deficiência na sua capacidade de estimular a resposta imune. De fato, uma baixa expressão de HLA-DR em monócitos correlaciona-se com liberação reduzida de citocinas pró-inflamatórias, como TNFα e IL-1, assim como redução na geração de radicais de oxigênio após estimulação "*in vitro*" com LPS (59,60).

As evidências de expressão diminuída de HLA-DR e comprometimento da capacidade funcional de monócitos de sangue periférico foram interpretadas por Bone e Volk como uma resposta antiinflamatória compensatória secundária (CARS), produzida em reação a uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica prévia (59,61). Pacientes com expressão de HLA-DR em monócitos inferior a 30% das células por mais de 3 ou 4 dias apresentavam mortalidade superior a 85% (59,62,63). Entretanto, a existência de um estado de imunodeficiência não se restringe à supressão da expressão do antígeno monocitário MHC classe II; níveis circulantes de IL-10 e TGF-β inibem a proliferação antígeno-específica dos linfócitos T (64-67) e podem contribuir para a ocorrência de anergia e apoptose nesta população (68-70).

A morte celular por apoptose (morte celular programada) pode ser responsável pela anergia vista nos estados de sepse. Células em apoptose induzem anergia ou liberação de citocinas antiinflamatórias, ao contrário das células necróticas, que causam estimulação imune e aumentam as defesas antimicrobianas. Isto foi demonstrado em estudos de autópsia com fragmentos de baço; nos pacientes com sepse, encontraram-se folículos linfóides menores e em quantidades reduzidas quando comparados com os pacientes com trauma isolado, sem sepse (71-73).

Em verdade, em estudos de necrópsia na sepse, foi observada perda apoptótica profunda de células do sistema imune adaptativo (70,74,75). Embora não tenha ocorrido perda de células T CD8+, linfócitos NK ou macrófagos, observou-se uma diminuição significativa dos níveis de células B, linfócitos T CD4+ e células dendríticas foliculares. A perda de linfócitos e células dendríticas ocorreu durante infecções graves, quando se esperaria haver expansão clonal de linfócitos. Essas informações são importantes porque tem sido a base para a proposição de novas modalidades de abordagem clínica, de forma semelhante aos modelos animais que demonstraram que a prevenção da depleção de linfócitos melhora a probabilidade de sobrevida na sepse (76,77).

A experiência clínica revela que alguns pacientes saem desse perfil de imunossupressão, embora não esteja ainda esclarecido como a imunossupressão se resolve. Sabe-se que IL-10 eventualmente suprime sua própria secreção, o que contribui para auto-limitar a resposta contra-inflamatória (78). Ainda, pelo menos em tese, uma imunossupressão persistente, por outro lado, também pode ser capaz de provocar uma reação pró-inflamatória compensatória.

O estágio de **dissonância imunológica** representa a fase final, geralmente irreversível, da FOM. Nessa situação, forças pró e anti-inflamatórias reforçam-se umas às outras, criando uma situação inadequada, deletéria e progressiva, que foge ao controle homeostático e conduz ao acúmulo de falências orgânicas. O grande desarranjo da resposta imunológica resultaria de

picos simultâneos de mediadores promotores e inibidores da inflamação. Esta situação ocorre, por exemplo, na doença meningocócica letal, onde os níveis de IL-10 no soro e líquor elevam-se e correlacionam-se positivamente com as concentrações elevadas de TNFα, IL-6 e IL-8 (79). Isto equivaleria à presença simultânea de SIRS e CARS no mesmo paciente, situação denominada síndrome da resposta inflamatória mista antagônica (MARS) (3,61).

Recentemente, foi efetivamente demonstrado que o período de imunossupressão, avaliado pela expressão monocítica de HLA-DR, pode coincidir com a resposta inflamatória inicial de pacientes com sepse grave (80), evidenciando novamente a dificuldade de se acomodar as várias observações clínicas, envolvendo os fenômenos inflamatórios da sepse, dentro de um único modelo.

Em alguns pacientes parece haver oscilação entre períodos de imunossupressão e inflamação, como por exemplo, naqueles que desenvolvem uma infecção secundária após um curto período de imunossupressão. Nesses casos, desenvolve-se uma segunda resposta pró-inflamatória, que irá provocar outra reação antiinflamatória, e assim por diante, num círculo de retroalimentação que, em geral, conduzirá o paciente ao óbito. Isto é evidenciado por estudos que demonstram que os níveis de citocinas flutuam largamente por muitas semanas após lesões inicialmente devidas a queimaduras (81-83).

I.4 – Imunossenescência – Um Fenômeno Pouco Conhecido

A imunossenescência tem sido classicamente vista como um declínio funcional, progressivo e irreversível, associado ao envelhecimento, da orquestra imunológica envolvida na defesa contra a invasão de patógenos e/ou células tumorais. Entretanto, estudos recentes têm levado a uma revisão deste conceito. Considerada mais do que uma simples diminuição da atividade ou exaustão do sistema imune, a imunossenescência é uma disfunção orgânica possivelmente tratável, e até potencialmente reversível (84,85).

Em termos da imunidade inata, as alterações mais comumente encontradas incluem a diminuição no número das células dendríticas, bem como na sua função como apresentadora de antígenos (86,87). Macrófagos ativados de doadores idosos apresentam baixa toxicidade contra células tumorais, com diminuição na produção de IL-1 e óxido nítrico (88), que são essenciais para a inibição do crescimento e destruição de células neoplásicas – esses dados podem estar diretamente envolvidos na maior suscetibilidade dos pacientes idosos às infecções e às neoplasias malignas. – Entretanto, quanto à expressão de moléculas HLA-DR e de ICAM (molécula de adesão intercelular) em células dendríticas, um artigo publicado por Yuan *et al*,

em 1994, não encontrou alterações em relação a indivíduos jovens (89). De forma alternativa, a regulação da expressão de moléculas HLA-DR em monócitos, ao longo do processo de envelhecimento humano, ainda não é perfeitamente entendida, havendo evidências sugestivas de reduções nas quantidades absolutas de antígeno por célula e das porcentagens de células que as expressam (90,91), ao mesmo tempo em que há ponderações quanto à inexistência de alterações (92).

O sistema complemento também parece ser afetado pelo envelhecimento normal do sistema imune. Diferentemente de pacientes jovens, os idosos não apresentam elevações significativas dos níveis séricos das proteínas do complemento ao serem expostos a bacteremias. Como a razão exata (diminuição de produção *versus* aumento do consumo) e a significância específica dessa alteração ainda não estão bem compreendidas (93), esse ponto constitui-se num alvo possível de futuras pesquisas.

Em termos da imunidade específica, ou adaptativa, há alterações descritas nas linhagens e funções dos linfócitos B e T. Estão descritas alterações na atividade (diminuição) citotóxica mediada por linfócitos T, na produção (diminuição) de anticorpos de elevada afinidade antigênica – permitindo que células próprias (ou *self*) possam ser reconhecidas como antígenos estranhos, desencadeando a apoptose – e nas respostas (diminuição) linfocíticas do tipo Th1 (atividade pró-inflamatória,via síntese de TNF, IL-2 e interferon$_{\gamma}$), alterando a atividade dos macrófagos e a produção de IgG pelos linfócitos B (94-96). Existe mesmo uma alteração mais difusa de certas populações de linfócitos T – elevadas concentrações de IL-6 e IL-10 no sangue de pacientes idosos (97,98) indicam um predomínio da atividade do tipo Th2 (antiinflamatória), que é envolvida na ativação de mastócitos, eosinófilos e linfócitos B, além da inibição da atividade dos macrófagos. Em verdade, o compartimento dos linfócitos T parece ser o mais afetado pela imunossenescência, seja na distribuição proporcional de subtipos celulares e em suas funções específicas, seja na correlata expressão de marcadores de superfície (99,100).

Dado o papel central dos linfócitos T auxiliares na regência da resposta imune e a dependência das células apresentadoras de antígeno do sistema imune inato para sua ativação, é plausível que parte significativa da disfunção observada na população de linfócitos T durante a imunossenescência esteja relacionada a transtornos na expressão de moléculas de superfície responsáveis pela apresentação de antígeno nas células do sistema imune inato, como os monócitos/macrófagos (84,99,101).

A imunidade humoral encontra-se também afetada, como anteriormente exposto, havendo redução do número de linfócitos B circulantes (102) e queda na produção de anticorpos específicos (103) – com diminuição na defesa contra patógenos infecciosos e menores taxas de

sucesso às vacinações –, gerando uma maior concentração de anticorpos capazes de reagir cruzadamente com antígenos próprios do paciente – e conseqüente auto-imunidade (104).

Quanto à imunidade nas superfícies mucosas, cumpre informar que o processo de imunossenescência se caracteriza pela menor capacidade migratória das células produtoras de IgA mucosa – e conseqüente diminuição na produção local dessa imunoglobulina –, o que certamente contribui para a redução da eficiência dos mecanismos de barreira natural às infecções nas superfícies mucosas (105,106).

Em conjunto, as alterações encontradas no sistema imune de indivíduos idosos deram origem, no final da década passada, à hipótese de *inflamm-aging* (neologismo anglicano derivado da superposição entre inflamação e envelhecimento), segundo a qual um aumento progressivo no estado pró-inflamatório disparado principalmente por células do sistema monócito-macrofagocitário caracteriza o processo de envelhecimento (107). Recentemente, em razão de uma melhor compreensão do tema, apoiada na observação de que pacientes em idades extremas (centenários, por exemplo) apresentam evidências de atividade antiinflamatória, uma versão revisada da teoria ("*anti-inflamm-aging remodelling inflamm-aging"*) sustenta que uma contraposição entre *inflamm-aging* e mecanismos antiinflamatórios representa a pedra angular para um envelhecimento com êxito (108). Logo, é esperado que indivíduos idosos relativamente saudáveis apresentem evidências de atividade antiinflamatória, como reduções na expressão monocitária de HLA-DR e outros marcadores imunológicos de superfície.

I.5 – Detecção da Atividade Inflamatória

A resposta sistêmica aos estímulos inflamatórios, ao processar-se de forma particular em cada indivíduo, impossibilita a previsão de um curso clínico uniforme para todos os pacientes acometidos. O que se tenta, ainda hoje, entender é o motivo pelo qual um mesmo estímulo desencadeia respostas tão antagônicas (inflamação ou antiinflamação) e a razão para a incapacidade das defesas orgânicas em superar a agressão. Quais seriam os mecanismos que favoreceriam uma melhor evolução clínica, sem a progressão para o óbito? Seria a gravidade do estímulo ou sua persistência? Estaria o padrão de resposta determinado geneticamente? Isto se torna extremamente importante, diante da alta mortalidade ainda encontrada nos estados de sepse. Como é possível atuar na sepse de maneira a modificar a evolução desse processo?

Parâmetros clínicos e biológicos para diagnóstico e acompanhamento das infecções são numerosos. Temperatura corporal e leucometria (109), quantificação de polimorfonucleares e mononucleares, nível sérico de proteína C reativa (PCR) (80,109-111), procalcitonina (PCT)

(80,111,112) e determinação sérica de citocinas (111), dentre outros, estão associados em graus variáveis com infecção e inflamação, mas nenhum deles permite uma definição precisa do estado de competência imunológica do paciente. Parece que a relação IL-10/TNFα (que pode distinguir SIRS de CARS) é um melhor preditor da evolução final de pacientes com sepse do que a mensuração de citocinas individuais/individualmente (113). É cada vez mais evidente que precisamos definitivamente lançar mão de biomarcadores que melhor e mais precisamente identifiquem e demonstrem, à beira do leito, o estado de competência imunológica de cada paciente (100,114).

Este procedimento depende do desenvolvimento e validação de medidas para a monitoração dos processos inflamatórios e das respostas individuais, como forma de melhor compreender o padrão de evolução inflamatória na sepse, possibilitando atuação mais específica em cada paciente para diagnosticar-lhe o padrão dominante de resposta inflamatória e, se necessário, conduzi-lo a uma situação de equilíbrio e retorno à homeostase.

1.6 – Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma tecnologia que permite uma variedade de aferições em células, organelas celulares e outros elementos em suspensão, fluindo com velocidades elevadas através de uma câmara de fluxo (115). A suspensão é introduzida sob pressão e conduzida no sistema com uma velocidade de 10 m/s, o que, nos aparelhos mais modernos, permite a análise de 20.000 a 30.000 células por segundo.

Cada célula ao atravessar individualmente um feixe de laser, causa dispersão, absorção ou emissão de luz fluorescente. Lentes óticas posicionadas em ângulos diversos coletam frações da luz e as transmitem até fotomultiplicadores, que medem sua intensidade e transformam os sinais óticos em pulsos elétricos, o que forma a base de todas as medidas na citometria de fluxo. O ângulo de dispersão da luz é utilizado para discriminar as populações celulares: a dispersão frontal (FSC – *forward scatter*) analisa o tamanho das células e a lateral (SSC – *side scatter*) avalia a rugosidade e a complexidade das células (ver Figura 1). Anticorpos monoclonais e outros marcadores celulares, conjugados a substâncias fluorescentes, permitem estudar as células de interesse e caracterizar subpopulações celulares (116).

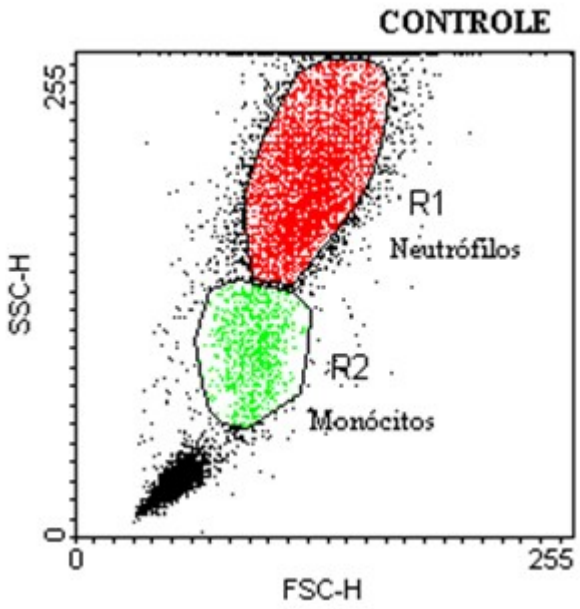


Figura 1. Gráfico FSC x SSC obtido à Citometria de Fuxo. Através da análise da dispersão frontal (FSC – *forward scatter*) da luz, é possível classificar o tamanho dos elementos celulares em trânsito pelo citômetro. Pela análise da dispersão lateral (SSC – *side scatter*) da luz, é possível identificar os agrupamentos das células com características similares em termos de rugosidade e complexidade celular. Dessa forma, dois aglomerados de elementos celulares com características similares em termos de volume e rugosidade – regiões 1 (R1) e 2 (R2) – são identificados, correspondendo aos neutrófilos e monócitos em trânsito pelo citômetro.

A citometria de fluxo vem sendo utilizada na imunofenotipagem de doenças de base imunológica, na análise funcional de células (medidas de fagocitose e metabolismo oxidativo), na análise do conteúdo de DNA, citogenética e identificação de células tumorais, dentre outros fins.

I.7 – Fenótipo e Função das Subpopulações de Leucócitos

Componentes elementares do sistema imune inato, neutrófilos e monócitos-macrófagos não apresentam níveis estáveis de atividade funcional. Em resposta a vários estímulos, atividades funcionais como secreção de citocinas, expressão de moléculas de superfície, liberação de espécies reativas de oxigênio ou fagocitose, podem se apresentar deprimidas ou estimuladas. Diz-se que essas células encontram-se "ativadas" quando atingem um patamar funcional superior, seja na expressão de antígenos de superfície associados à ativação funcional, seja no que diz respeito à capacidade de destruição de alvos microbianos (117).

O desenvolvimento de novas metodologias para a avaliação das subpopulações celulares quanto às suas funções e fenótipos tem contribuído de forma expressiva para o entendimento e

acompanhamento dos processos infecciosos, fornecendo uma visão mais global dos mesmos. Dentre os avanços metodológicos adaptados à técnica de citometria de fluxo, destacam-se sua utilização na determinação do fenótipo de monócitos de sangue periférico e na análise da fagocitose e produção de radicais livres de oxigênio por macrófagos e neutrófilos de sangue periférico (118-122). Com estas técnicas é possível determinar quantitativamente o número de moléculas presentes na superfície celular. Por exemplo, a determinação quantitativa de antígenos HLA-DR em monócitos, uma metodologia ainda não aplicada de forma rotineira ao estudo da sepse, tem o potencial de traduzir sua capacidade de atuar como células apresentadoras de antígeno.

Na avaliação da resposta inflamatória, também é possível utilizar a citometria de fluxo para avaliar a expressão do antígeno CD64 (receptor FC gama do tipo I –FCγRI – marcador de ativação de fagócitos) (123,124). Este é um dos receptores Fc para imunoglobulina, expressando-se em monócitos, macrófagos e, em níveis mais baixos, em polimorfonucleares e células dendríticas – neutrófilos e monócitos expressam três receptores distintos, FcγRI, FcγRII e FcγRIII, para a porção Fc da molécula de IgG. – A expressão quantitativa de CD64 em monócitos e neutrófilos tem sido estudada como um indicador de infecção e SIRS, havendo evidências de que pode discriminar entre sepse e SIRS não-séptica (125-128).

Em prévio trabalho na FCM/UERJ, Carvalho utilizou metodologia similar à nossa e observou que as manifestações de imunoparalisia são mais precoces na sepse do que anteriormente pensado. Dentre outros achados, ele demonstrou que os neutrófilos de pacientes na fase inflamatória da sepse mostravam comprometimento em sua capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio após estímulo e que tais pacientes apresentavam diminuição importante no número de moléculas HLA-DR expressas na superfície de monócitos (5). A partir de tais achados, restou a dúvida se a ocorrência da imunoparalisia precoce em tal amostra deveu-se ao fato de terem sido incluídos pacientes idosos e/ou muito graves, que, conforme postulado por Hotchkiss (1), manifestariam mais precocemente a atividade imunoparalizante, ou se o modelo clássico da atividade imunológica na sepse está errado e, desde o início, coexistem os dois fenômenos. Alternativamente, poderiam tais alterações ser tão somente devidas a imunossenescência?

II. OBJETIVOS

Em função da maior prevalência de pacientes idosos nas UTIs e da relativa escassez de exatidão no conhecimento em torno do fenômeno da imunossenescência, e considerando estar

bem caracterizado, na literatura específica, que a diminuição da expressão de moléculas HLA-DR na superfície de monócitos circulantes na corrente sangüínea de pacientes sépticos se constitui num bom marcador de CARS, tornou-se imperioso estudar o padrão normal de expressão molecular de tais antígenos em idosos não-sépticos. Dessa forma, foram os seguintes os objetivos do presente estudo:

- Detectar o padrão de expressão de moléculas HLA DR e CD64 em monócitos do sangue periférico (protocolo apresentado no Anexo E);
- Estabelecer correlações entre o fenômeno do envelhecimento e a intensidade da expressão molecular de tais antígenos;
- Detectar parâmetros que permitam distinguir entre imunossenescência e imunoparalisia;
- Identificar o perfil habitual dos pacientes sépticos atendidos localmente, no HUPE, que comporiam o grupo controle final, a cujos resultados imunológicos seriam contrastados os achados verificados em idosos não-sépticos e controles saudáveis de meia-idade.

Tais objetivos foram perseguidos em duas etapas distintas, que resultaram em dois significativos artigos, cujos textos originais foram submetidos a revistas internacionais de elevado impacto e são apresentados a seguir.

III. ARTIGO I

A prospective view of sepsis in a public academic hospital of a middle-income country: Descriptive epidemiology, timing of diagnosis, microbiology and outlook.*

Mário Castro Alvarez-Perez [1]
Rachel de Lima Grynstpan [2]
Adriana Mendes Gonçalves de Sá [2]
João Marcelo Castelpoggi da Costa [2]
Alessandra dos Santos Domingues [2]
Jose Hermógenes Rocco Suassuna [3]

[1] Program for Curricular Integration of Emergency Medicine. Department of Clinical Medicine. Hospital Universitário Pedro Ernesto. Faculty of Medical Sciences. Rio de Janeiro State University. Rio de Janeiro, Brazil.

[2] Medical Intern. Hospital Universitário Pedro Ernesto. Faculty of Medical Sciences. Rio de Janeiro State University. Rio de Janeiro, Brazil.

[3] Clinical and Academic Unit of Nephrology, Department of Internal Medicine. Hospital Universitário Pedro Ernesto. Faculty of Medical Sciences. Rio de Janeiro State University. Rio de Janeiro, Brazil.

[4] Kidney Assistance/CDR Serviços Hospitalares. Rio de Janeiro, Brazil.

Keywords. Sepsis; Critical Care; Epidemiology; Outcome; Developing country; Teaching Hospital

Corresponding author: Jose Hermógenes Rocco Suassuna**.** Clinical and Academic Unit of Nephrology. Hospital Universitário Pedro Ernesto. Boulevard Vinte e Oito de Setembro, 77, 3° andar. 20551-030, Rio de Janeiro, Brazil. Phone +55 21 25876227**.** Fax +55 21 25876227. e-mail: rocco@uerj.br

* Artigo submetido à revista *Critical Care Medicine*.

Abstract

Introduction. Sepsis is as a major contemporary health problem. Selected interventions, particularly when implemented early along the sepsis process can reduce sepsis-associated morbidity and mortality. There are concerns about the feasibility these measures in low and middle-income countries particularly in public hospitals, which face resource and organizational constraints that limit intensive care bed availability for the critically ill. The purpose of this study was to prospectively analyze the occurrence of sepsis, including descriptive epidemiology, clinical course, associated comorbidities, microbiological findings, and outcome in a tertiary urban teaching hospital from a middle-income developing country. We also sought to ascertain whether sepsis could be identified in a timely fashion.

Design: Observational cohort study.

Setting: University hospital in Rio de Janeiro, Brazil.

Patients: Adult patients admitted to the hospital between August 18 and September 16, 2008, excluding admissions of psychiatric cases and for short procedures. A surveillance group was trained to record all cases with sepsis based on the 2001 consensus criteria.

Interventions: None.

Results. Out of the 797 patients that composed the hospital cohort sepsis was diagnosed in 47 patients, yielding an occurrence rate of 5.9 per 100 patients, and an incidence density of 6.4 per 1000 patient-days. Associated major comorbidity was found in 81% of the cases and 34% of the patients were managed in the wards. Sepsis was detected late (72% evolving for more than 12 hours) and in advanced stages as indicated by severity and organ failure scores. The proportion of sepsis, severe sepsis and septic shock was 10.9, 34.8, and 54.3%, respectively. Gram-negative bacteria predominated (57%) and pneumonia was the most common primary infection. The survival rate was 52% and median hospital length of stay 15.6 days.

Conclusions. We found a high incidence of sepsis and a high burden of comorbid disorders. Technology for the care of critically ill patients was available but subjected to cost and organizational constraints. Several barriers to optimal sepsis management were indentified including difficulty in rapidly identifying patients, lack of assessment of tissue perfusion, advanced sepsis at the moment of the diagnosis, scarcity of ICU beds and a high prevalence of nosocomial pathogens. We believe that our results provide relevant information to general hospitals from low and middle-income countries.

Introduction

Information derived from multiple datasets clearly established sepsis as a major contemporary health problem . Still, despite many recent advances, therapeutic success remains relatively limited , particularly in the setting of severe sepsis and ensuing major organ failure . As a matter of fact, once severe sepsis sets in, along comes its associated burden of cost, suffering, disability, and mortality . There is mounting evidence however that selected interventions, such as quantitative resuscitation strategies and initiation of appropriate antibiotics , can reduce sepsis-associated morbidity and mortality, mainly when implemented at an early stage of the sepsis process.

The surviving sepsis campaign (SSC) is a collaborative effort of experts that seeks to improve the mortality of sepsis through the development and wide dissemination of guidelines aimed at increased awareness, timely diagnosis, and optimal evidence-based management . Not surprisingly, virtually all of the studies that substantiated the SCC recommendations were conducted in the developed world and were derived from patients assisted in emergency and/or intensive care units. As already pointed out, the generalizability of these findings may not be applicable to patients from less developed countries .

A further complicating issue is that in many developing countries healthcare is delivered by mixed public and private systems , with a potential for discrepancies in the level, quality, and cost of the service provided . In this particular sense, at least in Brazil, most academic hospitals are affiliated to the public sector and face limitations in intensive care staffing and availability of resources . In addition, available ICUs in middle-income countries (MICs) are often undersized and have a low patient turnover . The consequent shortage of ICU beds results in acute patients being cared for in general hospital wards, even when hemodynamically unstable or in respiratory failure .

The purpose of this study was to prospectively analyze the occurrence of sepsis, including descriptive epidemiology, clinical course, associated comorbidities, microbiological findings, and outcome in a tertiary urban academic hospital from a middle-income developing country (MIC). We also sought to ascertain whether detection and treatment of sepsis would take place predominantly in the ICU or in the hospital wards and whether it could be identified in a timely fashion as regarding the SSC recommendations for early intervention.

Materials & Methods

The Setting

Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), a 560-bed urban complex in the city of Rio de Janeiro, is the teaching hospital of the Faculty of Medical Sciences from Rio de Janeiro State University that admits on average 13,000 patients per year. HUPE does not have an open emergency department but has 38 adult intensive or intermediate care beds with dedicated staff. Virtually all patients are admitted from two multispecialty outpatient clinics (240,000 outpatient visits/year) or from outside referral. Case mix leans toward high complexity, as day cases are not admitted (i.e. are managed in the outpatient clinic) and the majority of basic and medium complexity situations are managed in peripheral hospitals. For patients in the wards, the hospital maintains a centralized on-call call acute care team, composed of clinicians, surgeons, pediatricians, residents, interns and undergraduate medical students, for each day of the week, providing 24-hour coverage. Hospital staff is expected to refer all patients with serious or potentially serious illness to the on-call team of the day.

Study Design and Patients

The institutional review board approved the study and written informed consent was obtained from the patient or proxy. The study design was prospective, observational, and non-interventional. All patients admitted with a diagnosis of sepsis or that developed it along the study period were included. Patients were excluded if they younger than 18 years or were admitted to the psychiatry wing or other units performing low complexity procedures with a minimal risk for developing sepsis (e.g. ophthalmology).

The 30-day enrollment period began on August 18 and continued until September 16, 2008. In the southern hemisphere this particular timeframe is past the height of the seasonal variation related to influenza-associated respiratory infections. At the time of inclusion of each case in the study, a report form with demographic and clinical data was completed. Clinical outcome data collection continued until death or discharge from the hospital. Hospital records were reviewed at 6 months to collect any pending laboratory or clinical data.

A surveillance group, composed of residents, interns and medical students volunteers from each acute care on-call team, was trained to record all referred cases with suspected sepsis. The diagnosis of sepsis followed the last international Sepsis Consensus Conference definitions .

Sepsis was considered as detected early when it was diagnosed within 12 hours from its estimated initiation.

Measurements and Outcome Variables

We recorded demographic and clinical data, comorbidities, hemodynamic, respiratory and laboratory parameters, microbiological data, and selected medical interventions (need for vasopressors and mechanical ventilation, and use of steroids and insulin). We recorded criteria for the diagnosis of sepsis, severe sepsis and septic shock, calculated APACHE II and IV scores and assessed organ dysfunction by computing SOFA and SAPS II scores . Unavailable clinical and laboratory data was considered to be within the normal range. For missing variables that do not change sharply (such as serum bilirubin and creatinine), we considered the value measured on the closest day.

The attending team conducted the microbiology workup and established the primary site of infection. Infections were classified as respiratory, urinary, abdominal, line/device-associated, other (meningeal, skin, endocarditis, etc.) and uncertain. Establishment of an infection as nosocomial was based on CDC criteria .

Statistical Analysis

Results are expressed as mean ± SD for normally distributed variables. Numerical variables with non-parametric distribution and ordinal variables are presented as median and interquartile range. Categorical variables are presented as percentages. We used the Student t test for independent samples with normal distribution and the non-parametric Mann-Whitney test for continuous variables for which the assumption of normality was rejected and for ordinal variables. For comparison of qualitative data, we applied the Chi-square ($\chi 2$) or the Fisher Exact test as appropriate. The Kaplan–Meier method was used to calculate survival and the logrank test was employed to compare survival of patients in different groups. All tests were two-tailed. The 95% confidence interval (95% CI) was calculated for the incidence rates. A p value ≤ 0.05 was considered significant.

Twenty-eight demographic, clinical and laboratorial predictor variables were evaluated regarding their influence on the dichotomous outcome of survival or death. These were: age, gender, ethnicity, early detection of sepsis, ward or ICU case, severity (sepsis/severe sepsis/septic shock), primary site of infection (respiratory, urinary tract, gastrointestinal tract, line/device, and other), lung Injury (ALI/ARDS), urinary output, fever, immunodeficiency,

mechanical ventilation, need for vasopressors, bacteremia, microbial isolation from suspected source, serum creatinine, arterial pH, WBC count, absolute count of band forms on peripheral blood smear, hemoglobin, and platelet count). To reduce the number of variables under consideration, logistic regression was carried out in two steps: univariate selection with the strict p value of ≤ 0.05 followed by forward multivariate regression. Statistical analysis was performed with the SPSS software.

Results

During the 30-day study period, out of 1365 patients, 797 patients fulfilled the inclusion criteria and composed the hospital cohort. Sepsis was diagnosed in 47 patients, representing an occurrence rate of 5.9 per 100 patients, and an incidence density of 6.4 per 1000 patient-days. Twenty-one patients (45%) had sepsis on admission and the remaining 26 cases were diagnosed at various times along the hospital stay. Mean hospital length of stay before the diagnosis of sepsis was 9 days. Early sepsis (evolving for less than 12 hours) could only be detected in a minority of cases (28%).

Table 1 summarizes the characteristics of the patients at enrollment. Median age of was 60 years. There was no gender predominance but self attributed white race preponderated. Most patients (57.4%) were admitted for medical conditions. At least a single major comorbidity was observed in 81% of the patients. The proportion of sepsis, severe sepsis and septic shock was respectively 10.7%, 34.0% and 55.3%. Mean hospital length of stay was 9.2 days for the hospital cohort and 15.6 days for patients with sepsis.

Although the majority of cases were in intensive or intermediate care units, one third of the patients developed sepsis while in the wards. Of these 16 patients, only five could later be admitted to a specialized care unit. Overall survival was 52%. There was no significant difference in mortality between patients with sepsis who remained in the hospital floors versus those transferred to acute care units and between patients with early versus late diagnosis.

The variables septic shock, respiratory infection, urinary output, need for vasopressors, arterial pH, platelet count, and SAPS II score were selected in the univariate step. After multivariate analysis, the variables independently associated with mortality were the presence of septic shock, respiratory infection, and pH.

As shown in table 2, the commonest primary site of infection was the respiratory tract (46.8%), followed by the urinary tract (14.9%) and from abdominal/gastrointestinal sources (10.7%). Less than half of the patients presented with fever and only 32 % were bacteremic. The microbiological results are depicted in figure 1. Gram-negatives were identified in 57 % of the isolates. These were mainly *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter sp.*, and three species of *Enterobacter*. Among the Gram-positives, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and enterococci were the dominant microorganisms. Drug-resistant strains from the "ESKAPE" group , chiefly *Acinetobacter sp.* and MRSA, were identified in 19% of all isolates and in 32% of the isolates.

Discussion

One of the many misleading consequences of dichotomizing the world into developed and developing countries is that the labels "developing" or low-income and middle-income countries" (LMICs) implies a degree of homogeneity that obscures the wide continuum of characteristics that includes poverty, availability of resources, industrialization, education, and social development among these nations. At one extreme there are countries where the majority of the population lives in absolute poverty. In contrast, other countries have passed through the demographic transition but have such wide gaps in wealth distribution that can be conceived as two countries that occupy the same territory; one that is sparsely populated, progressive and rich and another that remains poor, crowded and stagnant . Predictably this heterogeneity translates to health care and biomedical research . Sepsis studies in developing countries tend to blur these discrepancies by inadvertently lumping together data from widely diverse countries or from these distinctly different socio-economical realities within the same country .

Our study assessed the impact of sepsis in an urban resource-constrained Brazilian academic public hospital that, almost exclusively, caters to low-income individuals. Secondly and distinctly from other studies from this country, by including patients in the intensive and intermediate care units and also those admitted to the wards, it attempted to draw a more comprehensive profile. This was an essential prerequisite, as the deficit of acute care beds in the public health system of middle-income countries (MICs) may force critically ill patients to remain in the hospital wards, either all along their septic course or for a long waiting time before an eventual transfer to the ICU .

The occurrence rate of sepsis of 5.8 per 100 hospital admissions was twice as many as the figures reported in the US and France . However, the case definition, population database, and design between these studies and ours were markedly different. Furthermore, our results were obtained in a single center over 30 days while those other studies collected a much more sizable sample for at least a calendar year . Nevertheless, part of this discrepancy might be attributed to the fact that the study was conducted at a tertiary public teaching hospital that tends to receive patients with more severe illness, as discussed below.

As expected, the observed incidence density of 6.4 per 1,000 patient-days was much lower than in the study BASES (57.9 per 1,000 patient-days), also conducted in Brazil but based exclusively on ICU admissions . Nevertheless, despite minor differences probably explained by statistical variation due to small sample size, the demographics of our cases are similar to previously published data, particularly as regards to Brazilian public teaching hospitals . Overall, the majority of septic patients were admitted for medical conditions (57.4%), which again is in agreement with previous studies .

In line with increasing burden of chronic diseases in MICs that have undergone the demographic transition , degenerative comorbid conditions associated with aging were observed in 81% of the cases, with a predominance of diabetes, pharmacologically induced immunosuppression, end stage renal failure, and malignancy. The percentage of patients with significant comorbidity was higher than in other epidemiological studies about sepsis, both from this country and from the US and France . It is also noteworthy that we dealt with a very sick group. Although virtually one third of the cases were from the wards, severity of illness and organ failure scores applied on the day of diagnosis were similar or higher than in patients managed exclusively in ICUs, either in developed or developing countries . This suggests that our patients had a higher burden of underlying comorbidity and were in a worse clinical state than most of the general hospital or ICU patients included in previous studies.

We found a low incidence of sepsis as opposed to severe sepsis and septic shock. This feature was also replicated in two Brazilian studies . However, we cannot rule out that mild cases originating in the wards, particularly those without organ dysfunction were missed. Although a surveillance team was set up, we relied on the attending physicians to submit a suspected case. Hence, patients whose illness was not severe enough to warrant referral to the hospital centralized on-call acute care team may have escaped detection. Conversely, it is possible that in general ward patients, sepsis may follow an initial insidious course that results in it being

detected at a later and more severe stage . This may be another piece of information that explains the high severity of illness of the cases identified in this study.

One of the central tenets of the SSC is the implementation of specific time-dependent intervention bundles . As such, any delay in the recognition of a suspected case may have an impact on patient morbidity and mortality. That was the reason for setting up a team to streamline the process of identification. Yet, perhaps due to the non-interventional design of the study, the ability to achieve this goal was rather limited. Even accepting a more liberal timeframe to characterize early detection, only 28% of cases were recognized within the first 12 hours of evolution. This may well reflect a low local awareness about the necessity for prompt diagnosis and intervention. However, it may be comparatively easier to reach a conclusive diagnosis of sepsis in the emergency department as compared to the hospital wards and even to the ICU. Once the patient is already hospitalized, the insidious natural history of sepsis alluded to above and a number of possible confounders, such as metabolic and electrolyte disturbances or adverse drug reactions, can obscure the clinical picture and delay the diagnosis.

The relative proportions of the different sources of primary infection in our cohort were in accordance to previously published reports. In particular, the respiratory tract was involved in 47% of the infections that progressed to overt sepsis. This is in agreement with studies from both middle-income and developed countries . The role of respiratory infections as a forerunner of sepsis could have been even more significant, were it not for two facts. Perhaps because the study included ward admissions, there was a low incidence of ventilator-associated pneumonia (VAP) (data not shown), which predominates in ICU patients . Additionally, although the study was conducted slightly past the Brazilian flu season , the impact of seasonal flu in Brazil has been lessened in recent years through the availability of free yearly immunization to all citizens above the age of 60 years .

The yield of blood cultures was very low (32%) and in as much as 38% of the patients a microbiological diagnosis was not reached. We believe that there is room for improvement in this regard, but it is noteworthy that this closely matches the findings of numerous other reports . Microbiological documentation of infection is not a requirement for the diagnosis sepsis, but appropriate antibiotic therapy positively influences survival . This underscores the necessity of knowing the profile of causative pathogens in one’s own institution. In our as well in other recent series from MICs, Gram-negative bacteria predominated , whereas the percentage split between Gram-negative and Gram-positive pathogens at present tends to be

more or less even in developed countries .

The emergence of multidrug resistant pathogens is a significant concern, particularly in LMICs where the access to newer and expensive antimicrobial drugs is limited . Not surprisingly, germs from the recently defined “ESKAPE group” (Enterococcus sp, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter sp, Pseudomonas aeruginosa, and Enterobacter sp.) of potentially drug-resistant nosocomial infections , represented 62% of all isolates. Multidrug-resistance (MDR) strains were restricted to this ESKAPE group where they comprised 31% of the isolates. The main concern in this regard were MRSA in 40% of *S. aureus* strains and, particularly, MDR *Acinetobacter sp.* (80% of the strains), which was solely sensitive to polymyxin B.

The 48% mortality rate in this study fell in the midrange of estimates from other MICs , including previous Brazilian reports . Similar survival has also been reported in recent prospective studies from developed countries . In actual fact, there are significant methodological differences among all these studies that preclude a direct comparison. Many studies were retrospective, catered to a different case mix, were restricted to ICU patients, and the contribution of important variables such as age and comorbidity also differed. Nevertheless, some features of our cohort might have adversely impacted the results. The study was conducted in a university-affiliated teaching hospital where mortality has been reported to be higher . There was also a high percentage of vasopressor use and mechanical ventilation, reflected in high severity and organ failure scores, and 81% of the patients had a major comorbid condition.

For ward patients the timely opportunity to be transferred to an ICU bed may have a positive impact on outcome. For instance, the development of septic shock in the hospital wards is associated with delays in the implementation of resuscitative efforts and with faster clinical deterioration . Counterintuitively, a few studies have shown a better prognosis for septic patients managed outside the ICU . However, apparently this was the result of a clinical decision to leave less severely affected in the wards rather than an obligatory course due to the lack of available ICU beds. We anticipated that managing sepsis in the ward would represent an adverse risk factor for mortality. This hypothesis was rejected. It may well be that in our institution, the distinctive organization of a centralized acute care on-call team with the task of following all severely ill patients at the bedside, contributed to mitigate some of the shortfalls of managing septic patients in the wards.

As variously reported in other studies, septic shock , lung infection and acidosis were independently associated with mortality. This last finding deserves further discussion. Increased blood lactate is associated with a worse prognosis in septic patients and is also a biomarker of tissue hypoperfusion and end-organ injury . Tools for assessing tissue perfusion including blood lactate levels were not available at our hospital but acidosis in patients with sepsis is also a prognostic tool and a biomarker of inadequate peripheral perfusion . The association of acidosis with mortality is a further indication that we detected patients at an advanced stage of the disease. On the other hand, this is a sign that we may be able to improve the outcome of our patients through the implementation of a more aggressive diagnostic and therapeutic approach along the lines proposed by the SSC.

Besides the small size of the sample, our study has other limitations. First, it was a single center study conducted over a short period of time at the later winter season in the southern hemisphere. This of course brings the question about the generalizability of our findings. Reassuringly the baseline demographic and clinical profile of our patients is very similar to those of two large Brazilian epidemiological studies that also included patients from public hospitals . Indeed, we expect that our findings pertain to sepsis care in other MICs that share much the same constraints that we had to deal with . Secondly, seasonal changes are much less pronounced in the Brazilian tropical belt as compared to developed countries in the northern hemisphere. Nevertheless there is a “flu season” that peaks in the winter , and was waning at the period of our study. Widespread free influenza vaccination of elderly citizens has decreased morbidity and mortality caused by respiratory diseases in our country but we cannot entirely rule out a seasonal influence on our findings. Thirdly, we strived to set up and train a surveillance team, but we depended on the attending medical teams throughout the hospital to entertain the diagnosis of sepsis in the first instance. A subtle detection bias is unavoidable as different medical specialties may have a higher awareness of sepsis and implement swifter diagnosis and action. Fourthly, the small size of the sample constrained the ability to test multiple variables as regards to mortality. We chose to employ univariate analysis to curtail the number of predictors entered in the multivariate calculation. We repeated the analysis with the forced inclusion of selected variables of interest, such as early versus late diagnosis and ward versus ICU case, but the results did not materially change (not shown). Lastly, there was no access to sophisticated interventions such as continuous renal replacement therapy, extracorporeal membrane oxygenation and activated protein C, to name a few. It is possible that the availability of some of these technologies could have lessened the morbidity and mortality

of our patients. However, simpler approaches including sepsis resuscitation and management bundles were also not into practice. In fact, our study stands as evidence that we may be able to lessen the burden of sepsis in the future, as there are clearly identified barriers to tackle that do not depend on substantial monetary investment.

In conclusion, we found a high incidence of sepsis in a teaching hospital of a middle-income country that is past the demographic transition. Accordingly we demonstrated its association with chronic comorbid disorders. Relatively advanced technology for the care of critically ill patients was available but subjected to cost and organizational constraints. We identified several barriers to the implementation of optimal sepsis management. These included: difficulty in rapidly identifying patients to optimize fluid status and early antibiotic initiation, unavailability of arterial blood lactate levels or other means for assessing tissue perfusion, advanced stage of sepsis at the time of the diagnosis, scarcity of ICU beds that mandates the treatment of seriously ill patients in the hospital wards and a high prevalence of microorganisms from the nosocomial ESKAPE group. Some of these problems are not expected to be solved in the short term, while others are possibly responsive to simple organizational changes. For instance, the already available particular set up of a daily 24-hour acute care on-call team with the participation of residents, interns, and medical students, allows the adoption of several interventions contained in the SSC bundles. This provides opportunities for both training and betterment of patient care. We believe that the results from this study reinforce the importance of sepsis as a major disease burden and provides relevant information to similar general teaching hospitals in low and middle-income countries.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' Contributions

MCAP contributed to the design and coordinated the study, set up the surveillance team, carried out statistical analyses, interpreted the data, and drafted the manuscript.

RLG, AMGS, JMCC, ASD participated in study design, screening of patients and acquisition of data.

JHRS conceived and designed the study, was involved with the statistical analysis and interpretation of the data, participated in the drafting and critically reviewed the manuscript.

All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank the clinicians, surgeons, nurses, residents and medical students from the intensive care units and particularly from the "Plantão Geral", the centralized on-call call acute care team from Hospital Universitário Pedro Ernesto, for embracing our research project.

We are also grateful to the Carlos Chagas Filho Research Foundation of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ) for financial support (Grants E26/170.434/2000, E26/110.294/2007).

Legends to figures

Figure 1. Types of microorganisms and sensitivity patterns of 79 isolates in patients with sepsis.

Tables and figures

Table 1. Baseline characteristics of patients with newly developed sepsis (n = 47).

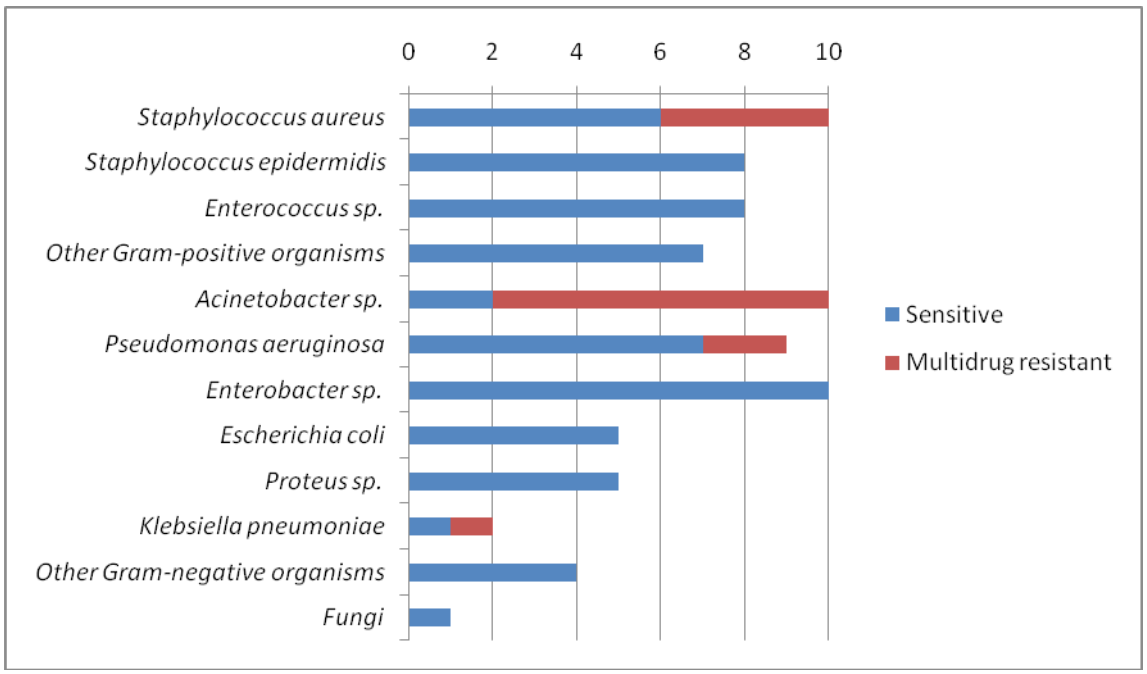
Age (median [IQR])	60 [40.5-74.5]

Male/female (%)	49.9/51.1
Ethnicity (% whites)	72.3
Type of admission (medical, surgical, obstetric)	57.4 / 38.3 / 4.3
Comorbidities (%) Diabetes mellitus Immunodeficiency End stage renal failure Malignancy Congestive heart failure Chronic limb ischemia Chronic respiratory disease Chronic hepatic failure	 27,7 23,4 23,4 21,3 14,9 10,6 4,3 4,3
General Hospital Beds/Intensive or Intermediate Care Beds (%)	34.0/66.0
Sepsis/Severe sepsis/Septic shock (%)	10.7/34.0/55.3
Vasopressor use (%)	53.2
Mechanical ventilation	70.2
APACHE II (median [IQR])	20 [14.25 – 23]
APACHE IV (median [IQR])	55.5 [39.5 – 78.25]
SOFA (median [IQR])	7.5 [5 – 10]
SAPS II (median [IQR])	41 [32.25 – 48.75]
Survival (%)	52
Hospital length of stay (mean)	15.6

Table 2. Features of the infectious process in the patients with sepsis.

Primary site of infection (%) • Respiratory • Urinary tract • Gastrointestinal tract • Line/device • Other foci • Uncertain	 46.8% 14.9% 10.7% 2.1% 8.5% 17.0%
Fever at presentation (%)	42.6%
Any culture positive (%)	61.7%
Blood culture positive (%)	31.9%

Figure 1.



References

IV. ARTIGO 2

The fine line between immunosenescence and immunoparalysis: Changes in the quantitative surface expression of CD64 and HLA-DR on monocytes of healthy and septic elderly individuals.[#]

Mário Castro Alvarez-Perez [1]
José Luis de Carvalho [2]

Marcela S. Sousa [3]
Marjorie M. M. Guimarães [3]
Ana Luisa Mattos-Guaraldi [4]
Geraldo M. B. Pereira [3,5]
Jose Hermógenes Rocco Suassuna [2,3,6]

[1] Program for Curricular Integration of Emergency Medicine. Department of Clinical Medicine. Hospital Universitário Pedro Ernesto. Faculty of Medical Sciences. Rio de Janeiro State University. Rio de Janeiro, Brazil.

[2] Clinical and Academic Unit of Nephrology, Department of Internal Medicine. Hospital Universitário Pedro Ernesto. Faculty of Medical Sciences. Rio de Janeiro State University. Rio de Janeiro, Brazil.

[3] Laboratory of Immunopathology. Department of Pathology and Laboratory Medicine. Hospital Universitário Pedro Ernesto. Faculty of Medical Sciences. Rio de Janeiro State University. Rio de Janeiro, Brazil.

[4] Department of Microbiology, Immunology and Parasitology. Hospital Universitário Pedro Ernesto. Faculty of Medical Sciences. Rio de Janeiro State University. Rio de Janeiro, Brazil.

[5] Laboratory of Cellular Microbiology. Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation.

[6] Kidney Assistance/CDR Serviços Hospitalares. Casa de Saúde São José. Rio de Janeiro, Brazil.

Keywords: Immunosenescence; Sepsis; Immunoparalysis; Flow cytometry; HLA-DR; CD64; Aging

Corresponding author: Jose Hermógenes Rocco Suassuna**.** Clinical and Academic Unit of Nephrology. Hospital Universitário Pedro Ernesto. Boulevard Vinte e Oito de Setembro, 77, 3° andar. 20551-030, Rio de Janeiro, Brazil. Phone +55 21 25876227**.** Fax +55 21 25876227. e-mail: rocco@uerj.br

[#] Artigo submetido à revista *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.

Abstract

Objective: To evaluate the quantitative expressions of HLA-DR and CD64 in peripheral blood monocytes from healthy and septic elderly subjects as compared to those of healthy younger individuals.

Patients and methods: Eleven septic patients (median age: 70.0 years), 27 healthy aged subjects (median age: 71.0 years) and 20 healthy younger individuals (median age: 55.5 years) were included in the study. Monocyte HLA-DR and CD64 expression levels were studied by two-color fluorescence quantitative flow cytometry using a panel of specific antibodies.

Results: Expression of CD64 and of HLA-DR on monocytes was lower in healthy elderly that in middle-aged individuals. Expression of both markers in healthy subjects was negatively correlated with age and positively correlated between them. Monocytic CD64 expression increased while HLA-DR decreased in septic elderly patients, but those with lower CD64 also displayed lower HLA-DR surface expression. The cutoff level for discriminating normal surface CD64 and HLA-DR expression from sepsis-induced changes was 9960 and 7052 molecules/monocyte, respectively.

Conclusion: There was an age-associated decline of surface expression of CD64 and HLA-DR on monocytes. It is unclear whether these age-associated changes are a negative feature or a marker of successful aging. Monocytic surface CD64 was upregulated while mHLA-DR was further downregulated in the early stage of sepsis. These parameters may be useful for monitoring the innate immune function of sepsis victims, but caution is recommended as quantitative expression levels can partially overlap with those of normal individuals, particularly of healthy elders.

Introduction

In both developed countries and developing countries past the demographic transition there is a progressive rise in the contingents of elderly persons . Many elders suffer from the cumulative incidence of chronic medical conditions that eventually compromise their health status and result in disability, frailty, increased hospital utilization, significant medical care expenses, and death . Old age is associated with a significant risk of developing sepsis and of dying in the intensive care unit (ICU) . Much of this risk can be ascribed to pre-existing comorbidity and to the severity of intercurrent illnesses . This growing aging population has already impacted intensive care unit (ICU) services and this is expected to rise in the coming years, yet again in developed and middle-income countries .

Even primary successful aging is associated with a progressive decline in the physiological reserve of most organ systems which results in increased vulnerability to contract events and a reduced capacity to withstand it . From the immunological standpoint age-related changes, collectively known as immunosenescence, affect multiple areas of immune function and result in increased susceptibility to infections, cancer and autoimmunity, and reduced vaccine efficacy . Immunosenescence disturbs virtually all the components of the immune system, the T-cell and B-cell compartments as well as innate immunity, but it is not homogeneous nor occurs at the same pace among individuals .

The innate immune system is characterized by non-specific self–non-self recognition and represents the first line of defense against microorganisms. Cells from the monocyte-macrophage lineage contribute to innate immunity mainly via phagocytosis, antigen-presentation, cytokine release, and wound healing . In particular, the expression of MHC class II proteins on these cells plays a key role in the bridge between innate and acquired immunity, being involved in antigen presentation to T lymphocytes and in the generation of the T cell repertoire in the thymus. Activation of T lymphocytes and the intensity of the immune response are quantitatively controlled by the level of expression of MHC class II molecules .

There are certain similarities between the behavior of the innate immune system of elderly healthy individuals and of septic patients. In both situations features of systemic inflammation and of impairment of the immune response coexist, albeit at different intensity. The fusion neologism “inflammaging” describes the concomitant chronic low-grade decline of innate immunity competence and progressive increase in proinflammatory status that characterize aging . The systemic inflammatory response syndrome (SIRS)/compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) paradigm describes the paradoxical association of a marked

systemic proinflammatory reaction with the dampening of several effector mechanisms of the immune system, resulting in a state of functional immunosuppression .

Increased expression of the activation marker Fc gamma receptor I (FcγRI or CD64) on phagocytes and deactivation of monocytes as indicated by reduced expression of HLA-DR are a feature of sepsis , being considered useful for diagnosis , immunomonitoring , and mortality prediction . The escalating number of elderly patients who develop sepsis and the availability of standardized quantitative techniques for estimating surface markers on monocytes offer an opportunity to better characterize the behavior of the innate immune system in health and after the development of sepsis in elderly individuals. Therefore, we studied quantitative monocytic surface expression of CD64 (mCD64) and of HLA-DR (mHLA-DR) in healthy elderly and middle-aged subjects. We contrasted these findings to those of elderly patients in the early days after the diagnosis of sepsis.

Materials and methods

Subjects

The ethics committee of Hospital Universitário Pedro Ernesto approved the research project. After informed consent, healthy aged subjects (≥ 65 years of age) from UnATI/UERJ (Open University for the Third Age/Universidade do Estado do Rio de Janeiro) recruited according to the SENIEUR protocol and healthy middle-aged volunteers (< 65 years of age) were included in the study. Samples from elderly septic patients, diagnosed according to the 2001 Consensus Conference criteria , were aliquoted from blood draw in the morning for laboratory routine work-up at the ICU of Casa de Saúde São José, Rio de Janeiro. To maximize specificity, the collection of these samples was timed to coincide with peak C-reactive protein levels in the acute early phase of sepsis, as others have reported . No additional samples were taken from these patients.

Monoclonal antibodies

Quantitative HLA-DR expression on the cell surface of peripheral blood monocytes was measured by two-color fluorescence flow cytometry using the Quantibrite monoclonal phycoerythrin (PE)-conjugated anti-HLA-DR /Anti-monocyte peridin chlorophyll (PerCP-Cy5.5)-conjugated anti-CD14-antibodies kit. Expression of CD64 on monocytes was evaluated

with the Quantibrite monoclonal PE-conjugated anti-CD64/CD45 PerCP kit. All materials were from Becton Dickinson (BD) Biosciences, San Jose, CA.

Sample preparation and staining procedure

Peripheral venous blood (2 ml) was drawn into sterile heparinized tubes. Healthy individuals had their blood drawn in the morning between 9:00 and 11:30 h and all samples were immediately processed after collection. Whole blood (50µl) was incubated with the monoclonal antibodies combinations of the Quantibrite kits (30 min, 4ºC, under light protection). Samples were then diluted and spun at 1500 rpm (10 min, 4ºC). After RBC lysis with FACS lysing solution, the sample was washed twice in FACS-buffer and fixated with 1% paraformaldehyde in PBS.

Flow cytometry analysis and quantification

Analysis was performed in a 2-laser FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences). Monocytes were gated on forward versus size scatter and analyzed with the CELLQuest Pro software (BD Biosciences). Quantification of the number of HLA-DR and CD64 molecules expressed per cell was performed according to manufacturer instruction using as reference four microscopic bead populations (Quantibrite; BD Biosciences) coated with well-defined quantities of PE molecules (range of 10^3 to 10^5 molecules per bead). The beads were analyzed by flow cytometry with the same protocol as the cells. A calibration curve was constructed by plotting geometric mean fluorescence intensities of the bead populations against the number of fluorescent molecules per bead. Specific antibodies with known PE:antibody ratios were then used for the determination of the absolute number of HLA-DR and of CD64 molecules expressed per monocyte (m/c) – plotted on graphics with logarithmic scales.

Statistical analysis

Data are described as median and interquartile (IQR) range. The groups were analyzed using Kruskal-Wallis and Dunn's tests. Pearson's correlation and linear regression were calculated to examine relationships between variables. Receiver operating characteristics (ROC) analyses were performed to discriminate the monocytic expression of the surface molecules in healthy and septic elderly individuals and the optimal cut-off point was determined using the Youden index (sensitivity + specificity-1). Values of $p < 0.05$ were considered significant. All analyses were performed using GraphPad Prism version 5.0c for MacOS (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

Results

Median age of the 11 septic patients was 70 years, three had severe sepsis and eight were in septic shock. Inclusion was between one and four days (median of two) after the first sign of sepsis. Median APACHE II score was 22 (IQR 18-28) and median serum C-reactive protein level was 311 mg/l (IQR 221-345) at the day of the blood sample collection. Six patients ultimately died. Median age of the 27 healthy elderly subjects was 71 years and of the 20 healthy middle-aged controls was 55.5 years. There was no significant age difference between septic patients and healthy elderly subjects. Table 1 summarizes the demographic data pertinent to these groups.

Expression of CD64

The number of CD64 molecules on the surface of monocytes decreased significantly ($r = -0.61$, $P<0.001$) as healthy individuals grew older; the linear regression curve is on figure 1a. Healthy elderly subjects had a significantly lower median number of CD64 m/c than younger individuals (4,778 [IQR 3,321 – 7,007]) *versus* (6,615 [IQR 3,808 – 12,702]). For the whole group of healthy controls (middle- and old-aged) median CD64 expression was 5,160 m/c (IQR 3,715 – 7,709). Median CD64 expression in septic patients was higher than in both groups of healthy individuals (14,332 [IQR 10,108 – 38,426]). Figure 1b presents the box-plot and the statistical significance of the differences in CD64 expression among the 3 groups.

Expression HLA-DR

In healthy subjects HLA-DR and age were also negatively correlated ($r = -0.62$, $P<0.001$); the linear regression line is on figure 2a. The three study groups differed in terms of mHLA-DR expression. Healthy middle-aged individuals had significantly higher median expression of monocyte HLA-DR than elderly subjects; 25,182 m/c (IQR 16,526 – 34,850) *versus* 11,614 m/c (IQR 9,154 – 19,556) molecules per cell, which in turn was higher than in septic patients whose median expression of mHLA-DR was 4,526 m/c (IQR 3,292 – 10,131). For the whole group of healthy controls median HLA-DR surface expression was 16,424 m/c (IQR 10,192 – 26,551). Figure 2b presents the box-plot and the statistical significance of DR expression among the 3 groups.

Cutoff values for discriminating healthy from septic individuals (ROC analysis)

The cutoff value with optimum sensitivity and specificity for separating CD64 expression of septic patients from healthy individuals was 9,680 m/c (AUC 0.785, p = 0.003). In the case of mHLA-DR the cutoff was 7,052 m/c (AUC 0.838, p < 0.001). The ROC plots are presented on Figure 3. These results did not materially change when we repeated the analysis exclusively with healthy old-aged controls and elderly septic patients.

Correlation of CD 64 with HLA-DR expression in healthy individuals and in septic patients

There was a significant correlation between CD64 and HLA-DR monocyte surface expression (r = 0.74, P<0.001) in healthy persons. Figure 4a presents the linear regression plot of this association. A weaker association was also observed in septic patients (r = 0.62, P<0.05). Figure 4b shows the linear regression line.

Discussion

There is still much to learn about the biology of the immune system of old age. For once aging is not a homogenous process. The gap between chronological and biological age is subjected to great variability among individuals. Aging aggregates two mutually modifying but independent processes: physiologic decline and a higher prevalence of disease . Differences in genetic background, life-long behavioral and nutritional factors, cumulative burden of diseases, and socioeconomic status all contribute to confound the study of senescence, in particular of the immune system . This heterogeneity is transported to the ICU once the patient is admitted to it. Since the aging process of the immune system can play a role in the development of sepsis, we sought to separate changes promoted by sepsis from those of the aged human body. In addition, as it has been previously established that alterations in markers of immune status tend occur between 55 and 70 years , we selected this age range for inclusion in the study.

We found that quantitative monocytic surface expression of CD64 declined as age progressed. This is apparently a new finding as regards mCD64 although the design of the study does not allow the inference of a causal relationship. Neutrophil CD64 surface expression can aid the diagnosis of sepsis in both children and adults . The expression on monocytes has a similar kinetics of that on neutrophils, being also effective for the detection of infection and sepsis . Our findings support these observations. The surface expression of CD64 on monocytes was significantly elevated in early sepsis as compared to both groups of healthy individuals. In

addition to being an early biomarker of sepsis, overexpression of CD64 on neutrophils and monocytes has been associated with leukocyte dysfunction and higher granulocyte CD64 expression with adverse clinical outcome in sepsis . However, this is controversial since other reports correlated higher CD64 expression with increased phagocytic activity and lower mortality rates in septic patients .

A high level of expression of HLA-DR on the cell surface of monocytes and macrophages is a marker of innate immunocompetence whereas very low expression on monocytes are the hallmark of the "immunoparalysis" of sepsis . In earlier studies with the Quantibrite technique, mean mHLA-DR levels were reported as 29,880 m/c in a healthy control group with a mean age of 33 years and the lower normal reference level was quoted at 15,000 m/c . A subsequent publication reported a median value of 25,777 m/c in healthy individuals with median age of 41 years . A more recent report depicted two different measures of central tendency for mHLA-DR - median of 16,884 and mean of 21,955 m/c - in a control population with 35 years of median age . In our conditions, median mHLA-DR expression was 16,424 m/c for the whole group (median age of 66 years). Exclusively in the middle-aged group median mHLA-DR expression was 25,182 m/c with a 25% percentile of 16,526 and this was more in agreement with the original earlier estimates.

We extended the above observations by showing an age-associated decline in mHLA-DR in healthy subjects. In agreement with our findings, a murine *in vitro* study indicated that the transcription of MHC class II molecules was impaired in macrophages from aged animals . This was attributed to decreased availability of the transcription factors that regulate the class II promoter gene. Lower than normal mHLA-DR expression has already been described in healthy elderly subjects and purported as a feature of immunosenescence . However the evidence is conflicting. Two other studies were not able to detect age-associated changes in mHLA-DR expression . In particular, one of these studies also employed a quantitative, though in-house, method . It is difficult to reconcile the results but the method was different from ours, as the standardized quantitative procedure we followed became available at a much later date .

An altered circulating monocyte phenotype in early human sepsis, specifically diminished surface HLA-DR expression, was previously described by many groups . Based on the Quantibrite methodology, 5,725 and 5,000 HLA-DR m/c were proposed as cutoff values for the prediction of culture positive sepsis in postoperative cardiac patients and for the establishment of immunoparalysis , respectively. Another study reported median values of 4,354 m/c for

septic patients without shock and of 2,076 m/c for those with septic shock . Accordingly, we observed that the expression of mHLA-DR was downregulated in the early phase of sepsis (median 4,526 m/c). Given the shift toward increasing age of patients admitted to the ICU, this result was contrasted to that of healthy persons of a similar age group. Although our control reference level was lower than in previous reports there was still a significant difference between mHLA-DR expression between healthy and septic aged individuals.

We can only speculate about the functional impact of the age-dependent reduction in monocytic HLA expression. Our group of healthy elders was attending the UnATI (Open University for the Third Age) and was selected according to the stringent criteria of the SENIEUR protocol that excludes frail as well as acutely and chronically sick individuals . It is therefore clinically unsound to regard low mHLA-DR in this group as a marker of frailty or predisposition to sepsis. The finding also argues against the original hypothesis of inflammaging, where a progressive increase in proinflammatory status mainly driven by cells from the monocyte-macrophage system characterizes the aging process . On the other hand, it fits nicely within a revised version of the theory where the beneficial counteraction of anti-inflammaging upon inflammaging explains the coexistence of inflammation and a degree of immunodeficiency that characterizes successful “robust” aging . According to this view it is possible that the exclusion of inflamed unfit individuals and the resultant selection of individuals that aged in relatively good health, biased our results towards an anti-inflamed phenotype.

Although statistically different by ranked order, there was superposition of mCD64 and particularly of mHLA-DR levels in healthy and septic elderly individuals. In other words, in some normal old-aged subjects the surface expression of HLA-DR on monocytes was very low, within the range of septic patients. To determine the levels of mCD64 and mHLA-DR that provided better discrimination between the changes of immunosenescence and of immunoparalysis we generated ROC curves for both mCD64 and mHLA-DR. A rounded cutoff value of 9,700 m/c for mCD64 and of 7,000 m/c for HLA-DR provided the best combination of sensitivity and specificity. While there is no published reference for CD64, the cutoff level for mHLA-DR with the Quantibrite methodology is well below the previous reference level for the lower limit of normal and close to the proposed defining limit for “immunoparalysis” .

The significant correlation between CD64 and HLA-DR monocyte surface expression in healthy individuals suggests a concurrency of mechanisms. Moreover, although median mCD64 increased and mHLA-DR decreased in septic patients we still saw a correlation in the same

direction of age-related changes, i.e., low expression of CD64 was associated with low mHLA-DR. Regulation of CD64 on monocytes is complex and affected by a variety of stimuli. IFN-γ, IL-10, and G-CSF are the main upregulators while IL-4, IL-13, IL-1 and IFN-β have the opposite effect . Low expression of CD64 on monocytes and neutrophils of patients with sepsis has recently been correlated with monocyte deactivation, reduced phagocytic activity and higher risk of mortality, being also considered a hallmark of CARS . The expression of HLA-DR on monocytes is also influenced by a great number of extracellular mediators. IFN-γ , IL-4 , IL-13 , GM-CSF , and G-CSF increase mHLA-DR expression. Factors that downregulate mHLA-DR include IL-10 , TGF-β , cortisol , and LPS . Even though the expression of CD64 and HLA-DR on monocytes appear to be two flip sides of the same coin, as far as we know no single mediator can explain these parallel changes and a single explanatory mechanism is implausible. On the other hand, as also noticed by others , we selected these biomarkers exactly because they are the target of competing pro- and anti-inflammatory forces and may be regarded as an integrative tool that indicates the net dominant drive at any particular moment along the natural history of sepsis.

In conclusion, though our study suffer from a relatively small sample size, it followed a standardized methodology and provided new information with respect to the innate immunity behavior during healthy aging and the changes brought about by sepsis. Our results pointed to an age-associated decline of the surface expression of CD64 and HLA-DR on monocytes and found a significant positive correlation between the two markers in healthy individuals. Monocytic surface CD64 was upregulated while mHLA-DR was further downregulated in the early stage of sepsis. The superposition of the quantitative expression of both markers in old-aged healthy and septic subjects was discriminated by the calculation of cutoff values that may have clinical relevance to differentiate age-associated changes from the innate immunity response to sepsis. These findings leave in the open a number of compelling questions for future studies about the relationship between immunosenescence and immunoparalysis. For instance, it is still unclear whether low mHLA-DR in healthy elders is a marker of frailty or fitness and whether higher mCD64 in patients with sepsis is a good or a bad prognostic marker. Furthermore, it will of interest to know the status of mCD64 and mHLA-DR in elderly patients at risk of developing sepsis in order to determine if this information is clinically relevant. Lastly, since healthy elders are the exception and not the rule , we need to examine the profile of these biomarkers in frail elders with a high burden of chronic diseases, as they make up the fastest rising segment of the patient population admitted to our ICUs.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' Contributions

MCAP coordinated the study, screened and carried out medical examinations on the healthy individuals, acquired the data pertaining to the healthy elder individuals, performed the initial steps of the cytometric assays, carried out statistical analyses, and drafted the manuscript.

JLC participated in study design, was responsible for the screening and acquisition of data regarding the ICU patients, performed the initial steps of the cytometric assays, and helped in the interpretation of the data.

MSS and **MMMG** were responsible for processing, reading and analyzing the samples for flow cytometry.

ALMG and **GMBP** helped in the study design, were responsible for the interpretation of the cytometry results and reviewed the manuscript for intellectual content.

JHRS conceived and designed the study, was involved with the statistical analysis and interpretation of the clinical and laboratory data, participated in the drafting and revised critically the manuscript.

All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This research was supported by a one-time grant from Fundação do Rim Francisco Santino Filho (Rio de Janeiro, Brazil), by grant 466645/00-7 from the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPQ), and by the grants E26/170.434/2000, E26/110.294/2007, and E26/110.867/2008 from Carlos Chagas Filho Research Foundation of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ).

We are indebted to Fábio Miranda, Ricardo Rosenfeld and Bruno Ferreira for granting access to the septic patients, to Gustavo Gouvêa from Labcare at Casa de Saúde São José for providing

their blood samples, and to Célia Caldas and to all the staff from UnATI/UERJ for introducing us to their cohort of healthy elderly students.

Legends to figures

Figure 1. A. Plot of age versus quantitative CD64 molecule expression on monocytes. The line represents the linear regression curve. B. Monocyte CD64 expression in healthy middle-aged, healthy elderly, and in elderly septic patients. The results are expressed in median and IQR (boxes) and whiskers with minimal and maximum values ($r = -0.61$, $P<0.001$; $r^2=0.37$).

Figure 2. A. Plot of age versus quantitative HLA-DR expression on monocytes. B. Monocyte HLA-DR expression in healthy middle-aged, healthy elderly, and in elderly septic patients. The results are expressed in median and IQR (boxes) and whiskers with minimal and maximum values ($r = -0.62$, $P<0.001$; $r^2=0.38$).

Figure 3. ROC curves for best discrimination between normal monocyte surface expression in healthy individuals and the changes seen in septic elderly patients. A. Expression of CD64. The best cutoff was 9,680 molecules per monocyte (AUC 0.785, $p = 0.003$). B. Expression of HLA-DR. The optimal was cutoff was 7,052 m/c (AUC 0.822, $p < 0.001$).

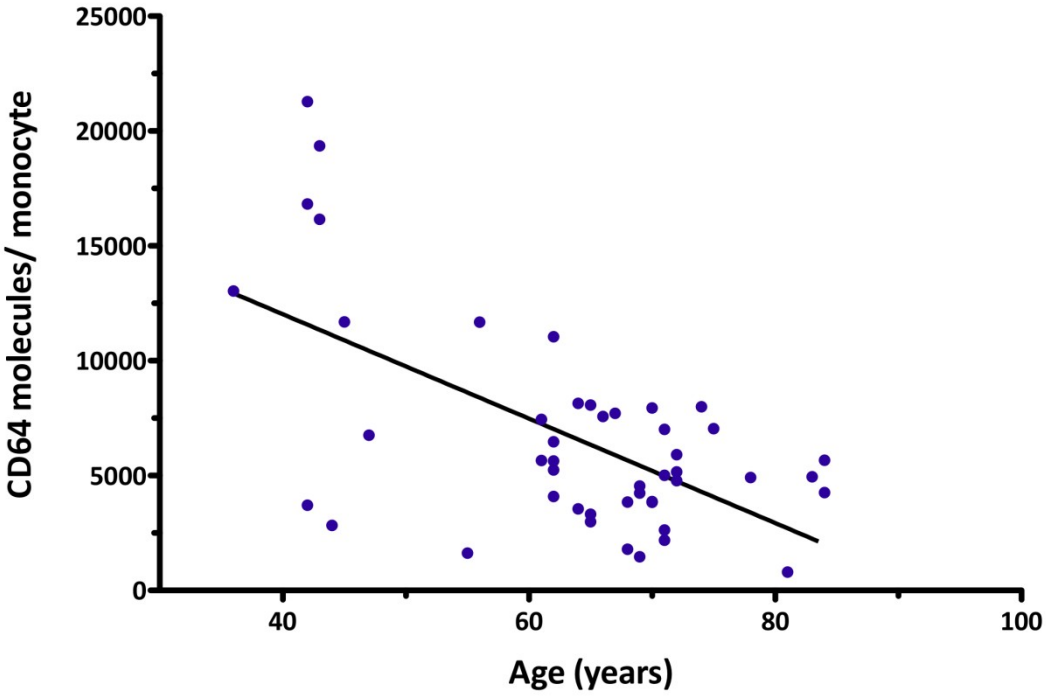
Figure 4. Plot and linear regression line of HLA-DR versus CD64 molecule expression on monocytes. A. Healthy individuals ($n=47$, $r=0.74$, $P<0.001$). B. Elderly septic patients ($n=11$, $r=0.62$, $P<0.05$).

Table 1. Characteristics of the healthy elderly and middle-aged subjects and of the septic patients.

	Healthy Middle-aged (n = 20)	Healthy Elderly (n = 27)	Septic Elderly (n = 11)
Age in years [Median (IQR)]	55.5 (43-62)	71.0 (68-74)	70.0 (65-79)
Gender (male/female)	9/11	8/19	7/4
Ethnicity (white/afro-descendant)	17/3	21/6	11/0

Figure 1.

A.


25000
20000
15000
10000
5000
0
CD64 molecules/ monocyte
40
60
80
100
Age (years)

B.

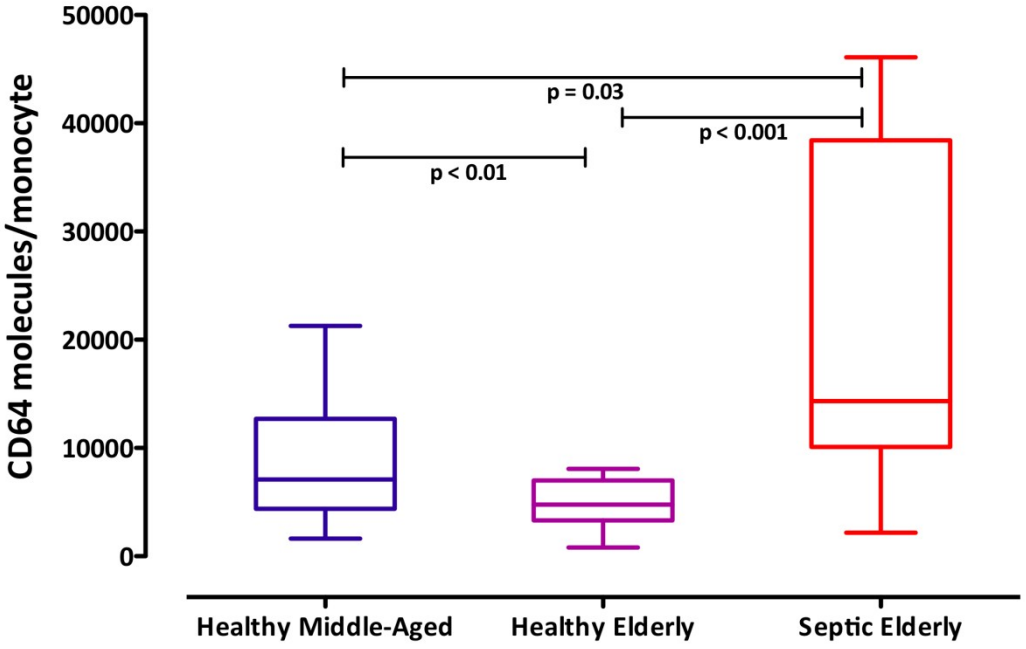
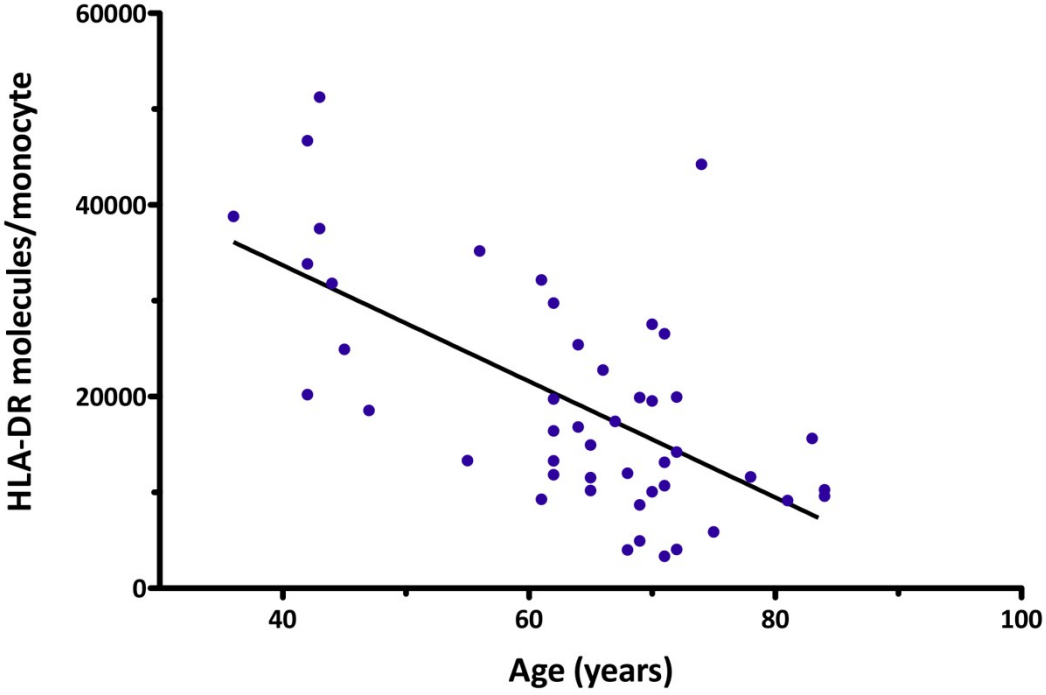

50000
40000
30000
20000
10000
0
CD64 molecules/monocyte
p = 0.03
p < 0.001
p < 0.01
Healthy Middle-Aged
Healthy Elderly
Septic Elderly

Figure 2.

A.


60000
40000
20000
0
HLA-DR molecules/monocyte
40
60
80
100
Age (years)

B.

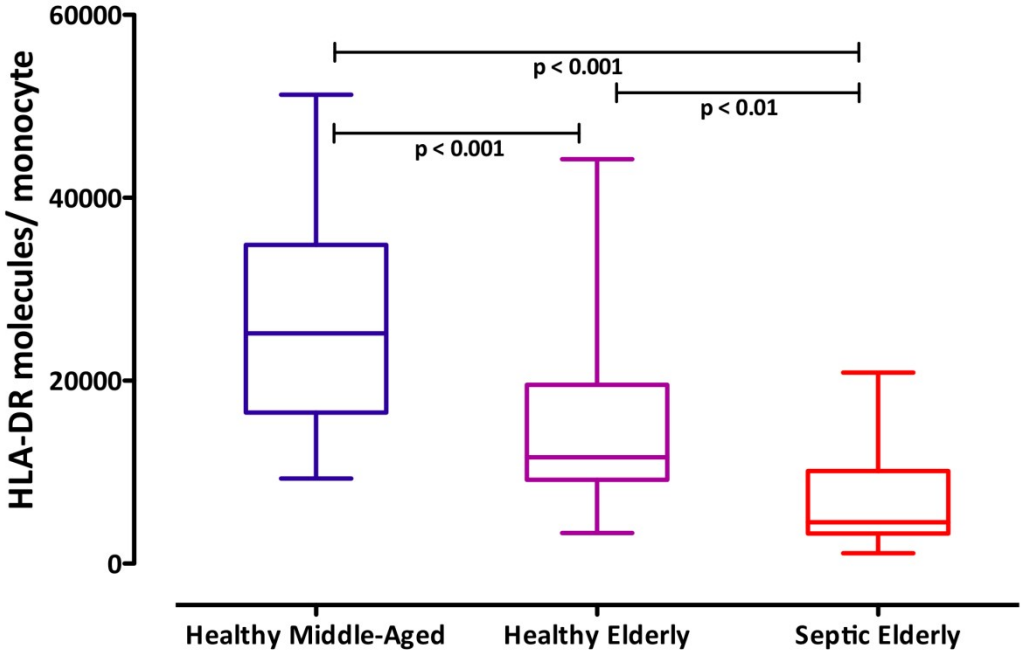
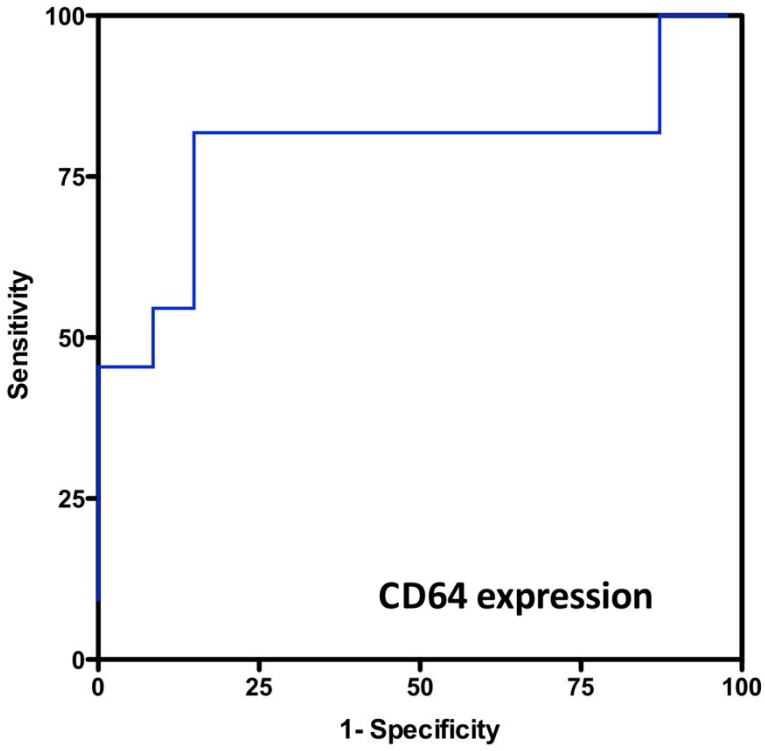

60000
40000
20000
0
HLA-DR molecules/ monocyte
p < 0.001
p < 0.01
p < 0.001
Healthy Middle-Aged
Healthy Elderly
Septic Elderly

Figure 3.

A.


100
75
50
25
0
Sensitivity
CD64 expression
0
25
50
75
100
1- Specificity

B.

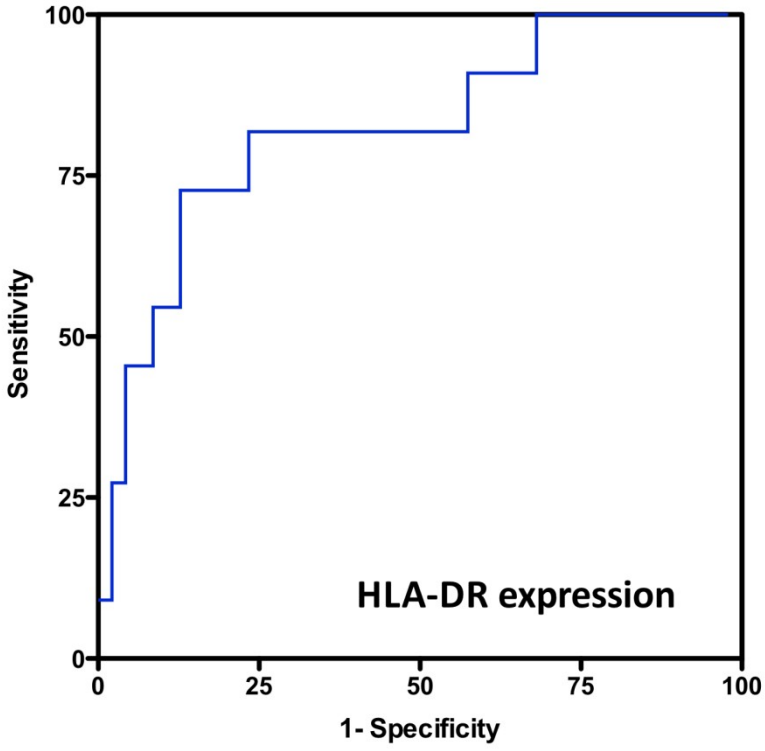
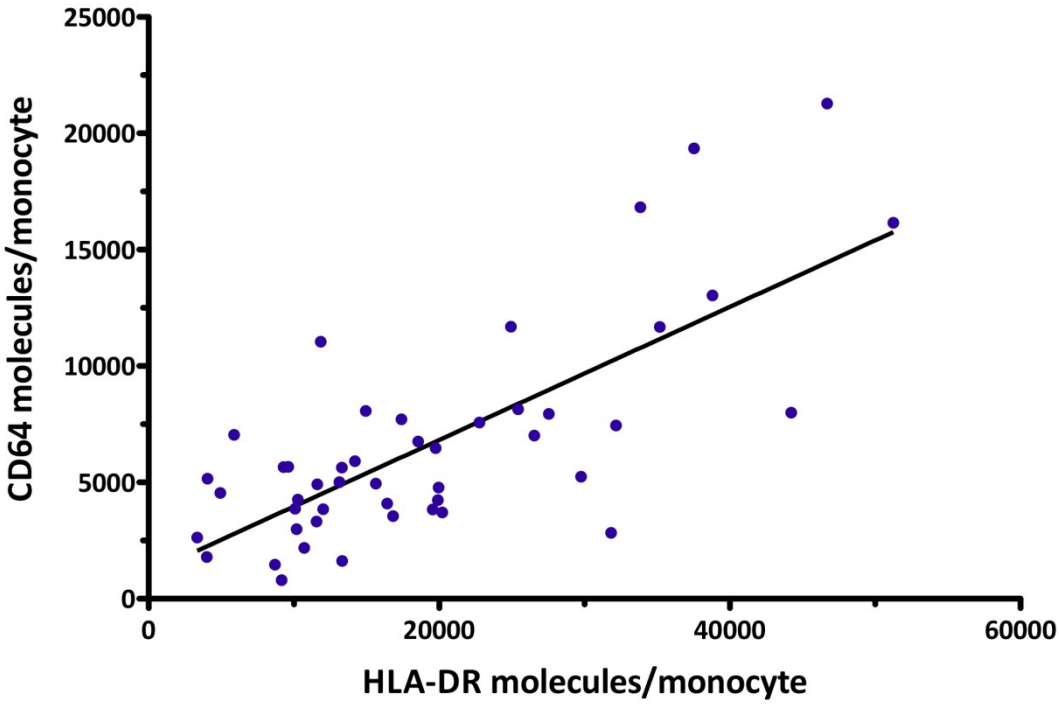
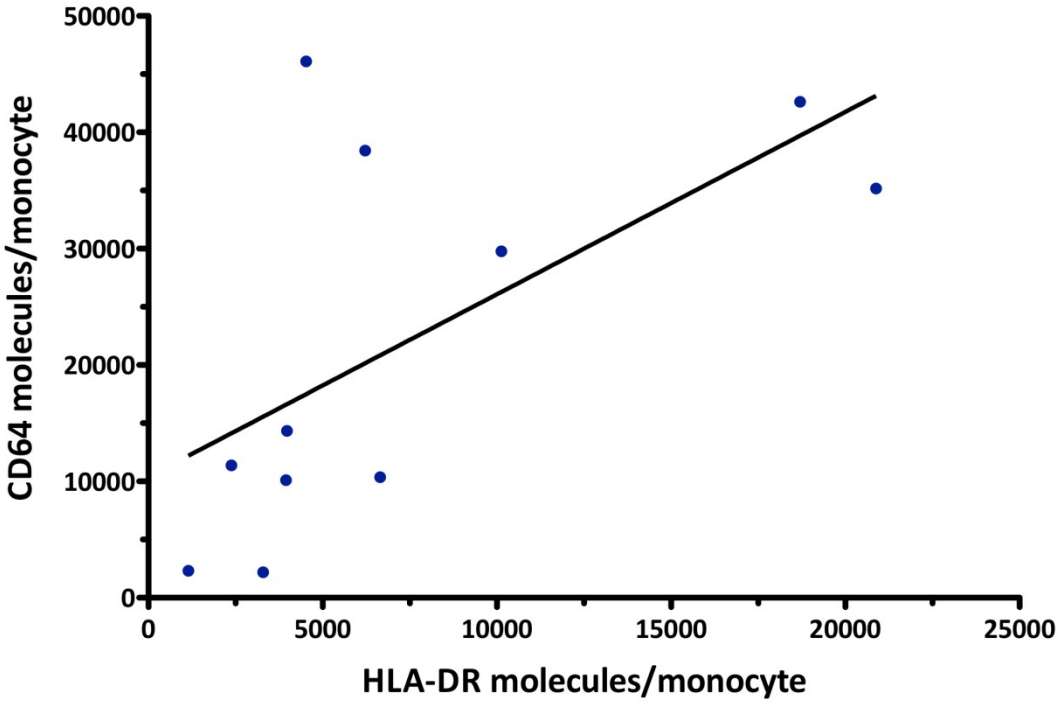

100
75
50
25
0
Sensitivity
HLA-DR expression
0
25
50
75
100
1- Specificity

Figure 4.

A.


25000
20000
15000
10000
5000
0
CD64 molecules/monocyte
0
20000
40000
60000
HLA-DR molecules/monocyte

B.


50000
40000
30000
20000
10000
0
CD64 molecules/monocyte
0
5000
10000
15000
20000
25000
HLA-DR molecules/monocyte

References

V. DISCUSSÃO

O presente estudo objetivou preencher lacunas de conhecimento sobre duas áreas ainda imprecisas da sepse. Em primeiro lugar, considerando-se a significativa escassez de leitos de terapia intensiva em nosso país, o que impede o acesso pleno (de todos os pacientes sépticos) a tais recursos, podemos assegurar que as taxas de incidência de sepse relatadas em estudos epidemiológicos nacionais, que efetivamente levaram em consideração apenas casos admitidos em UTIs, refletem o verdadeiro panorama nacional? (Ou, alternativamente, ao falarmos de tais taxas de incidência estamos, na verdade, nos referindo à taxa de incidência tratada, refletindo tão somente aquela fração de casos de sepse que chegam ao nosso conhecimento, posto que representam apenas os casos que tiveram acesso ao ambiente da terapia intensiva [129].) Em segundo lugar, considerando a esperada evolução do sistema imune inato para um comportamento antiinflamatório, cuja ocorrência temos evidências de poder ser bastante precoce (ainda nas primeiras horas de sepse), a presença de sub-regulação na expressão de moléculas de superfície responsáveis pela apresentação de antígenos sinaliza sempre atividade imunoparalizante? Ou, em pacientes idosos, pode tão somente traduzir um comportamento normal e esperado do sistema imune submetido à senescência? Ainda, se esses dois fenômenos ocorrem, há como discriminar entre ambos (imunosenescência *versus* imunoparalisia) com base nos resultados de exames procedidos à beira do leito?

De fato, temos suficientes informações que nos permitem crer na existência de uma real subnotificação de casos de sepse em nosso país, e no mundo inteiro a realidade não é muito diferente. Linde-Zwirble & Angus (129) alertam para essa situação e estabelecem uma analogia interessante, afirmando que o nome antigo da sepse era "causas naturais", realçando a incerteza quanto ao diagnóstico correto de muitos desfechos fatais e a conseqüente subnotificação da sepse (entre outros diagnósticos). Assim, apesar dos esforços empreitados pela *Surviving Sepsis Campaign* (36), não há como negar que não temos acesso a todos os casos de sepse, e que esse panorama é ainda mais grave nos países com maiores restrições de leitos de UTI.

Os resultados do nosso estudo epidemiológico reforçam essa visão. A constatação de que apenas 10,7% dos pacientes sépticos apresentavam formas mais brandas (sem sepse severa ou choque séptico), o que representa uma taxa proporcional bem inferior àquelas relatadas em outros estudos nacionais e internacionais, sugere que muitos casos escaparam à detecção da

equipe médica assistente e/ou não foram notificados. Assim, provavelmente, os parâmetros observados referem-se preferencialmente ao perfil local da sepse severa e as taxas de incidência, apenas ao subgrupo da sepse tratada (notificada).

Em verdade, grande parte das dificuldades experimentadas no reconhecimento da sepse deriva de sua heterogeneidade, tanto em termos de sua variabilidade de expressão entre diferentes pacientes com a mesma etiologia microbiológica e topografia de infecção, como da variabilidade entre doenças específicas em progressão para sepse. Em consonância com esse último ponto, os critérios definidores de caso de sepse elaborados em 1992 (15), ratificados e ampliados em 2003 (19), identificam, na verdade, um amplo espectro de condições clínicas infecciosas ao invés de uma doença simples, com características homogêneas. E num país como o nosso, com um sistema público de saúde complexo e em grande parte ineficiente, em que existe uma significativa intercessão com um sistema suplementar (privado) de saúde, com suas nuances e particularidades, revelam-se ainda mais heterogêneas as taxas de apresentação por localidade e as implícitas e decorrentes oportunidades de atendimento de pacientes sépticos. A propósito, no estudo Sepse Brasil, Sales Jr *et al* (12) observaram diferenças no perfil de gravidade dos pacientes sépticos conforme a região geográfica deste país, observando, por exemplo, uma maior gravidade dos pacientes tratados na região sul em oposição à daqueles da região sudeste. Como sabemos, essa dualidade de oportunidades e qualidades de assistência (pública versus suplementar) torna ainda mais heterogêneos os perfis dos pacientes submetidos às análises clínicas e epidemiológicas, comprometendo nossa capacidade de alcançar uma perfeita noção da real incidência da sepse no Brasil.

Nesse particular sentido, em nosso país, a maioria dos hospitais universitários é ligada ao setor público, enfrentando freqüentes e graves limitações de recursos humanos e tecnológicos (13). Por estas razões, decidimos estudar a epidemiologia da sepse em nosso hospital, um grande hospital universitário público da cidade do Rio de Janeiro, em que a realidade nacional da significativa escassez de leitos de terapia intensiva também é vigente.

Os resultados observados realmente indicam que os pacientes sépticos admitidos e tratados em todos os setores do Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HUPE) são mais frequentemente graves – 89,3% foram classificados como sepse severa ou choque séptico –, são reconhecidos mais tardiamente – apenas 28% foram notificados antes de decorridas 12 horas das primeiras evidências de sepse (identificadas pela auditoria dos registros médicos e de enfermagem assinalados no prontuário hospitalar) – e têm maior prevalência de comorbidades (81%). É notório que lidamos com um grupo de pacientes muito graves. Embora virtualmente um terço dos casos foram reconhecidos nas enfermarias, os

escores de gravidade (APACHE II [130]) e de disfunção orgânica (SOFA [131]) dos nossos pacientes, aplicados no dia do diagnóstico (vide anexo A), foram similares ou superiores àqueles de pacientes conduzidos exclusivamente em UTIs, seja em países desenvolvidos ou em desenvolvimento (11,12,132,133). Ainda, corroborando a crise (ou processo?!) de carência de leitos de terapia intensiva, apenas 5 dos 16 pacientes sépticos inicialmente identificados em enfermarias conseguiram posteriormente ser admitidos em uma unidade de cuidados especializados.

Estabelecendo um paralelo com nossa realidade sócio-econômica, que, segundo indicadores específicos da Organização das Nações Unidas (ONU) e de organismos internacionais correlatos (Organização Mundial da Saúde [OMS], Fundo Monetário Internacional), situa o Brasil como um país de médio aporte de recursos – e que já realizou a transição demográfica –, esperaríamos mesmo uma elevada porcentagem de pacientes com doenças crônicas degenerativas (134). Assim, a alta prevalência de comorbidades que encontramos (81%) e, em particular, o predomínio de doenças degenerativas como diabetes mellitus, doença renal crônica, imunossupressão farmacologicamente induzida e neoplasias malignas, representam achados que seriam intuitivamente esperados ao início de um estudo realizado num país em que a significativa geração de riqueza não se traduz em um direto e imediato bem-estar da população.

Em verdade, apesar de o Brasil ser classificado em 2005 – ano seguinte ao lançamento da *Surviving Sepsis Campaign* (36) – como a 11ª maior economia do mundo (PIB de $1,937 trilhão de dólares), o país ainda era classificado como o 69º em termos de desigualdade sócio-econômica (pelo coeficiente de Gini) e também como 69º nos termos do Índice de Desenvolvimento Humano (IDH). A OMS classificava-nos, então, como um país com baixa cobertura e qualidade de serviços públicos e com marcantes diferenças entre os cidadãos quanto ao risco de exposição a fatores de adoecimento e à viabilidade de acesso aos serviços de saúde. Nas últimas semanas, o mais recente relatório do Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD) – referente às informações coletadas em 2007 – alocou o Brasil na 75ª posição do *ranking* do IDH, com 0,813 pontos. Apesar de a pontuação obtida representar um alto nível de desenvolvimento (acima de 0,8 pontos), ocupamos posição intermediária na classificação – 182 países foram avaliados – e nossa posição no indicador específico da saúde é ainda pior (81ª colocação) (135).

De fato, o Brasil é um país com muitos contrastes e desigualdades, flagrantes entre as distintas regiões geográficas, mas também evidentes no micro-cosmos das grandes cidades. Um dos graves problemas discutidos no estudo epidemiológico sobre a sepse no HUPE foi o risco

concreto representado pela generalização de resultados oriundos de grandes estudos multicêntricos coletando informações de populações heterogêneas entre si e entre seus próprios componentes. Não raro, estudos importantes reúnem dados provenientes de países com aportes econômicos, índices de desigualdade e de bem-estar social distintos. A tentativa lógica de se identificar um indivíduo médio (ou mediano) representativo, ao nível mundial, do ser humano sofrendo de sepse, e a conseqüente padronização de estudos e da representatividade (validade externa) de seus resultados, faz-se às custas do comprometimento da qualidade dos resultados, posto que provêm de indivíduos com realidades distintas.

Considerando os princípios aludidos acima, revelou-se indispensável a busca de uma melhor caracterização da população a que submeteríamos exames de avaliação da competência do sistema imune e sua relação com alterações encontradas na sepse e na imunossenescência. Não desejávamos replicar os dados de países desenvolvidos, nem os de outras nações classificadas socioeconomicamente como similares ao Brasil, mas constatar a nossa própria realidade, aquela de um grande hospital geral, público e universitário, com sua implícita complexidade de casos e a habitual carência de leitos de terapia intensiva. Diferente ainda de importantes estudos epidemiológicos publicados sobre o assunto, elegemos um desenho prospectivo, que é sabidamente melhor que as análises retrospectivas para responder a algumas perguntas, particularmente sobre o risco de eventos (136).

Visando a viabilizar uma completa e ampla vigilância epidemiológica voltada à detecção de casos de sepse em todas as dependências do HUPE, foi estabelecida uma ampla estratégia de divulgação da programação do estudo. Um grupo de vigilância foi selecionado e treinado para a detecção da sepse – conforme os critérios definidores de consenso amplamente respaldados pela literatura pertinente (15,19). – Seus componentes pertenciam aos quadros do Plantão Geral do HUPE (denominado *Acute Care On-Call Team* no artigo original), tradicional serviço responsável pelo acompanhamento e tratamento de pacientes graves internados nas enfermarias de nosso hospital, que sempre é acionado assim que casos graves e críticos são reconhecidos pelas equipes de saúde assistentes. Além disso, as unidades fechadas do hospital foram notificadas com antecedência, sendo contatadas diariamente durante o período de inclusão do estudo.

Numa época em que se encontra em curso a importante *Surviving Sepsis Campaign*, com suas recomendações formais para um diagnóstico rápido e intervenções precoces, centradas em pacotes estabelecidos para as primeiras seis e as subseqüentes dezoito horas e reconhecidas como intervenções que reduzem a letalidade da sepse (36), um dos mais preocupantes resultados do nosso estudo foi a constatação de que cerca de 72% dos pacientes identificados

foram reconhecidos com mais de 12 horas de evolução, o que certamente sinaliza um enorme risco de não conseguirmos nos adequar às diretrizes recomendadas. Em consonância, mais frequentemente os pacientes estavam graves, encontrando-se 55,3% dos pacientes em choque séptico, variável que, associada à presença de acidemia – o nível sanguíneo de lactato é um marcador de hipoperfusão tecidual (137), de disfunção orgânica (138) e de pior prognóstico na sepse (137,139,140), e que provavelmente se correlacionou, nesta amostra, ao retardo no reconhecimento dos casos – e ao foco pulmonar, resistiu na análise multivariada como fator independente previsor do desfecho letal dos pacientes arrolados neste estudo.

Esse retardo no estabelecimento do diagnóstico pode refletir uma deficiente conscientização do corpo clínico do hospital acerca da necessidade de urgência na condução dos pacientes sépticos ou um alto limiar de suspeita para a condição – apesar de as diretrizes de 2001 (19) terem aumentado a sensibilidade da detecção. – Contudo, há evidências consistentes na literatura médica mundial de que é relativamente mais fácil chegar a um diagnóstico conclusivo de sepse no setor de emergência do que nas enfermarias (141,142) e até do que na UTI. Uma vez que um paciente já esteja internado por outra condição, a natureza inicialmente insidiosa da instalação da sepse e a presença de diversos possíveis fatores de confusão (como distúrbios metabólicos ou eletrolíticos, efeitos adversos de drogas, etc) podem obscurecer o quadro clínico e conduzir a retardos no diagnóstico. Assim, apesar de nossa reduzida taxa de sepse não-severa (10,7% dos casos) poder traduzir uma significativa subnotificação de casos – pacientes menos graves, evoluindo em um curso clínico mais insidioso e sem disfunções orgânicas, não teriam sido reconhecidos e/ou notificados ao Plantão Geral do HUPE –, é mais provável que os fatores anteriormente expostos melhor expliquem esse achado.

Curiosamente, no mais recente dos 4 grandes estudos epidemiológicos sobre a sepse no Brasil, Sogayar *et al* (13) encontraram uma freqüência de sepse não-complicada ainda menor (8,4%) nas 21 UTIs brasileiras pesquisadas. Embora essa baixa representação de casos brandos pudesse representar o efeito da limitação da oferta de vagas e a conseqüente seleção de casos mais graves para admissão, como esses dados divergem daqueles dos demais estudos epidemiológicos nacionais e nenhuma diferença significativa é estabelecida entre as UTIs arroladas nesse e nos demais estudos, nenhuma conclusão nesse sentido é possível, restando as hipóteses da heterogeneidade das populações estudadas e, de forma mais preocupante, de diferentes limiares de resposta e conscientização sobre a urgência do diagnóstico e intervenções na sepse.

Diante de tantos obstáculos à efetiva aplicação das recomendações preconizadas pela *Surviving Sepsis Campaign*, uma dúvida pertinente seria: afinal, qual o impacto de tais

omissões sobre a taxa de sobrevida dos pacientes arrolados? (Ainda mais ao considerarmos que o estudo foi conduzido num hospital universitário, ambiente em que as taxas de mortalidade da sepse têm sido relatadas como superiores [143]!)

A taxa de letalidade de 48%, verificada no presente estudo, situou-se aproximadamente ao meio termo da faixa de variação das taxas relatadas em outros países com classificações socioeconômicas similares ao Brasil (144-148) e foi similar ao que tem sido relatado em recentes estudos prospectivos realizados em países desenvolvidos (143,149,150), mas revelou-se levemente superior às taxas relatadas nos estudos epidemiológicos restritos ao Brasil (11-13). Por outro lado, no multicêntrico estudo PROGRESS (14), a taxa de letalidade restrita às UTIs brasileiras foi ainda superior (56%).

Em realidade, existem significativas diferenças metodológicas entre todos os estudos epidemiológicos mencionados, o que impede uma comparação direta e precisa. Muitos foram estudos retrospectivos, apresentaram proporções diversas de pacientes graves, foram restritos ao ambiente da terapia intensiva e tiveram diferentes contribuições relativas de variáveis importantes, como faixa etária e taxa de comorbidades. Entretanto, algumas características de nossa coorte poderiam ter conduzido a uma taxa de letalidade extremamente elevada, como a alta proporção de pacientes que apresentavam comorbidades, exigiram o uso de vasopressores para suporte hemodinâmico e/ou tornaram-se dependentes de assistência ventilatória mecânica, bem como o fato de o estudo ter sido conduzido em um hospital universitário e uma significativa porcentagem dos pacientes (23,4%) não ter chegado a ter acesso a uma unidade fechada, sendo acompanhados nas enfermarias do HUPE.

Com relação ao último ponto, embora seja intuitivamente esperado que o manejo de pacientes sépticos em enfermarias represente um fator de risco para o desfecho letal, não detectamos diferença estatisticamente significativa na taxa de letalidade dos pacientes sépticos mantidos nas enfermarias do hospital em relação àquela dos pacientes que foram transferidos para leitos de unidades fechadas. Curiosamente, há estudos sugerindo um melhor prognóstico para pacientes sépticos conduzidos fora do ambiente da terapia intensiva (151,152). Todavia, tal interpretação é provavelmente fruto de um viés de seleção, representado pela tendência natural de deixar pacientes menos gravemente enfermos nas enfermarias.

Em nosso estudo, em que os pacientes acompanhados nas enfermarias foram caracterizados como muito graves, a inexistência de diferenças de prognóstico pode ser atribuída a duas forças antagônicas, cada uma deslocando a probabilidade de óbito num sentido inverso. Em primeiro lugar, a existência do Plantão Geral, serviço bem organizado que tem a tarefa de acompanhar e tratar os pacientes graves internados nas unidades abertas do HUPE,

pode ter reduzido as limitações de qualidade no atendimento aos pacientes internados nas enfermarias do hospital; sendo um serviço contínuo, atuante em todos os horários de plantão, tais pacientes jamais deixaram de receber cuidados de boa qualidade, mesmo fora dos horários de rotina. Por outro lado, as implícitas limitações de um hospital público de um país de médio aporte de recursos, como a indisponibilidade da oferta de proteína C ativada recombinante humana, intervenção supostamente capaz de reduzir a taxa de mortalidade de pacientes com sepse severa/choque séptico (32), pode ter limitado, ao inviabilizar a completa aderência às recomendações da *Surviving Sepsis Campaign*, o impacto benéfico na sobrevida decorrente da admissão e tratamento numa UTI, por mais qualificados e competentes que seus recursos humanos sejam.

Em termos microbiológicos, chamou-nos a atenção o baixo rendimento dos métodos utilizados para isolamento dos agentes infecciosos envolvidos, particularmente das hemoculturas – apenas 32% dos pacientes tiveram hemoculturas positivas –, fato consistentemente reproduzido na literatura. Apesar de a documentação microbiológica da infecção não ser um pré-requisito indispensável para o diagnóstico da sepse, há consenso entre os especialistas de que o tratamento antibiótico apropriado (idealmente guiado pelo padrão de sensibilidade *in vitro* dos patógenos envolvidos) positivamente influencia a sobrevida (153). Acreditamos, assim, que haja necessidade de aprofundarmos o debate sobre as razões que conduziram a um comprometimento de nossa capacidade de identificar microbiologicamente os quadros de sepse detectados no HUPE, embora a taxa observada tenha se aproximado bastante das taxas encontradas em diversos outros estudos (32,147,153-156).

Seguindo um padrão ainda observado nos países em desenvolvimento, a maioria dos quadros sépticos em que se identificou o microrganismo causal foi devida a uma bactéria Gram-negativa (12,146,147); nos países desenvolvidos, ao longo dos últimos anos, tem sido observado um crescimento relativo da proporção de quadros devidos a patógenos Gram-positivos, que passaram a ser responsáveis pela maior parte dos quadros sépticos relatados em importantes trabalhos vindos de países de forte poderio econômico (23,149,156,157). Ainda, em sintonia com a crescente representação de patógenos multi-resistentes nas infecções hospitalares, encontramos uma alta porcentagem (62% de todos os isolados microbiológicos) de patógenos componentes do recém descrito grupo ESKAPE (*Enterococcus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter sp*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter sp*), conjunto de espécies bacterianas frequentemente associadas a importantes padrões de resistência a antibióticos (158). Cerca de 19% dos isolados microbiológicos em nosso estudo eram constituídos por patógenos multi-resistentes, sendo todos observados entre os patógenos

elencados no grupo ESKAPE; de forma alternativa, considerando-se apenas os isolados representados por patógenos ESKAPE, 31% tinham padrões de resistência antibiótica múltipla.

Além do pequeno tamanho da amostra coletada e analisada, nosso estudo epidemiológico apresentou outras limitações. Em primeiro lugar, por ser um estudo realizado apenas em um centro e ter abrangido somente um curto espaço de tempo, resta a dúvida quanto à validade externa dos resultados observados. Entretanto, de forma tranqüilizadora, as características demográficas e o perfil clínico dos pacientes arrolados em nosso estudo são muito parecidos com aqueles relatados em 2 grandes estudos epidemiológicos brasileiros que também incluíram pacientes admitidos em hospitais públicos (11,12).

Além disso, o predomínio do foco pulmonar como sítio primário da sepse poderia estar relacionado ao fato de o estudo ter sido conduzido ao final do inverno, ainda mais considerando-se que o período de sua realização coincidiu com a fase final da epidemia de influenza no ano de 2008, no hemisfério sul. De forma análoga, Sales Jr *et al* (12) ao realizarem seu estudo no mesmo período do ano (agosto e setembro), encontraram similar predominância das infecções respiratórias na gênese da sepse. Entretanto, de uma forma generalizada, esse perfil tem sido constante na literatura mundial, independentemente do período de inclusão e *follow-up* e da região geográfica do planeta. Além disso, é sabido que a campanha de vacinação anual anti-influenza, que é aplicada em larga escala em idosos do nosso país, tem conduzido a reduções nas taxas de morbidade e mortalidade por infecções pulmonares nesse estrato da população. Assim, apesar de ser inegável que as moléstias respiratórias apresentam picos de incidência nos meses de inverno, influências sazonais não parecem ter sido a causa da maior prevalência de infecções respiratórias em nossa amostra.

Outro eventual ponto limitante do presente estudo relaciona-se ao fato de que o reconhecimento inicial da sepse dependia diretamente do limiar de suspeita da equipe médica responsável pelo atendimento de cada um dos pacientes arrolados. Embora tivéssemos emprestado significativos esforços no sentido da seleção e treinamento de uma equipe habilitada a reconhecer a sepse, seu acionamento dependeu, diversas vezes, da suspeita clínica das equipes de cuidadores diretos. Assim, apesar da definição de caso confirmado ter sido seguramente baseada na aplicação de critérios técnicos bem definidos e aceitos internacionalmente, uma subnotificação de casos – especialmente os mais brandos (sepse não-severa) – poderia ser uma conseqüência direta do desenho do estudo. Entretanto, além das considerações anteriormente expostas, esta limitação é, em verdade, partilhada por todos os estudos que reúnem pacientes arrolados por pesquisadores distintos, especialmente os estudos

multicêntricos. Dessa forma, trata-se de limitação universal, e a comparação de estudos já se faz com dados que sofreram a mesma influência.

Além das limitações anteriores, o pequeno tamanho da amostra restringiu nossa capacidade de testar múltiplas variáveis potencialmente associadas a um desfecho letal. Procuramos, assim, proceder uma análise univariada, visando a reduzir o número de variáveis previsoras a serem submetidas à análise multivariada. Repetimos a análise com a inclusão forçada de algumas variáveis de interesse, que selecionamos em função da potencial ou provável associação com o desfecho letal, tais como a oposição entre diagnóstico precoce e tardio, e acompanhamento na UTI *versus* numa enfermaria, mas os resultados não mudaram significativamente.

Finalmente, nossos pacientes não tiveram acesso a intervenções sofisticadas, como, por exemplo, hemodiálise contínua, oxigenação por membrana extracorpórea e proteína C ativada recombinante humana. É razoável supor que a disponibilidade de algumas dessas tecnologias poderia ter conduzido a reduções na morbidade e mortalidade de nossos pacientes. Contudo, não podemos assegurar que mesmo outras abordagens mais simples, como a estratégia precoce de ressuscitação volêmica e outros (além da proteína C ativada) componentes do pacote de 24 horas da *Surviving Sepsis* Campaign, tenham sido colocadas em prática sempre que indicadas. De fato, nosso estudo representa mais uma forte evidência de que podemos ser capazes, no futuro, de reduzir a enorme carga representada pela sepse em nosso hospital, uma vez que identificamos claras barreiras cuja superação não depende de significativo investimento financeiro.

Assim, tendo por base a nossa realidade epidemiológica local, demonstrada pelos resultados do estudo que acabamos de analisar, direcionamo-nos para a segunda etapa do presente projeto, em que procuramos avaliar criticamente a inter-relação entre o comportamento normal do sistema imune inato de idosos relativamente saudáveis (sem evidências de imunodepressão espontânea ou de imunossupressão farmacologicamente induzida), em vigência do fenômeno da imunossenescência, e os transtornos imunológicos induzidos pela atividade antiinflamatória, compensatória, verificados na sepse. Para tanto, escolhemos estudar a expressão de antígenos HLA-DR na superfície de monócitos do sangue periférico (mHLA-DR), parâmetro que bem espelha a função apresentadora de antígenos do sistema imune inato, e, para especificar de uma forma ainda melhor o comportamento funcional de tais células, decidimos estudar a expressão do antígeno CD64 (FcγRI), molécula envolvida na extração de patógenos opsonizados por anticorpos. Além disso, selecionamos esses biomarcadores porque são alvos de inúmeras forças competidoras antagônicas (diversas citocinas e fatores, em particular IL-10 e

interferon-$_{\gamma}$), pró-inflamatórias e antiinflamatórias, podendo a análise de seu comportamento representar uma útil ferramenta integrada capaz de identificar a tendência dominante do sistema imune inato (inflamação *versus* antiinflamação) em cada momento particular da história natural da sepse.

Inicialmente, estudamos a expressão de tais antígenos de superfície em 27 indivíduos idosos (65 a 84 anos de idade) saudáveis (sem critérios de exclusão) e 20 voluntários saudáveis em meia-idade (36 a 64 anos) – anexos B e C. – A análise das medianas de expressão dessas moléculas nos 2 grupos agregados, revelou um coeficiente de correlação (r de Pearson) de magnitude moderada tanto para o HLA-DR como para o CD64 (-0,62 e -0,61, respectivamente; $p < 0,001$). Em ambos casos, as correlações foram estatisticamente significativas e, embora uma relação de causa-efeito não possa ser conclusivamente estabelecida, parece provável haver um decaimento idade-dependente nas intensidades de expressão de tais moléculas na superfície de monócitos humanos.

Embora novos estudos sejam necessários para que seja confirmado tal paradigma na imunossenescência – até porque, como já exposto anteriormente, os escassos estudos sobre o assunto geraram resultados contraditórios, não-uniformes –, as contagens médias detectadas serviram de parâmetro comparativo para detectar eventuais mudanças de comportamento do sistema imune nos pacientes idosos em franca sepse.

Ao estudarmos o padrão de expressão de tais antígenos de superfície em monócitos do sangue periférico de uma amostra de 11 pacientes sépticos (vide anexo D), observamos tendências antagônicas; enquanto as taxas de expressão de HLA-DR apresentavam reduções mais intensas, estatisticamente significativas, as intensidades de expressão de CD64 eram aumentadas, ainda mais intensas que as encontradas nos indivíduos de meia-idade ($p = 0,03$). Grande parte de nossa capacidade dedutiva dedicada ao estudo sobre as inter-relações entre imunossenescência e imunoparalisia – "*The fine line between immunosenescence and immunoparalysis: Changes in the surface expression of CD64 and HLA-DR on monocytes of healthy and septic elderly individuals*" – foi aplicada na busca da compreensão dos reais significados desses achados.

Observamos que pacientes sépticos com idades similares às de um grupo de indivíduos idosos saudáveis (mediana de 70,0 [IQR 65-79] *versus* 71,0 [IQR 68-74], respectivamente) tinham diminuições ainda mais intensas na expressão de antígenos HLA-DR em monócitos (expressão mediana em pacientes sépticos = 4.526 moléculas/célula [m/c; IQR 3.292 – 10.131] *versus* expressão mediana em idosos saudáveis = 11.614 m/c [IQR 9.154 – 19.556]; $p < 0,01$); nos indivíduos de meia-idade, a expressão de HLA-DR era significativamente maior (25.182

moléculas/célula [IQR 16.526 – 34.850]; $p < 0,001$). Ainda, em comparação ao grupo inteiro de adultos saudáveis, a expressão de antígenos HLA-DR (16.424 m/c [IQR 10.192 – 26.551]) foi significativamente maior que em nos pacientes sépticos ($p < 0,01$). Assim, é razoável supor que indivíduos idosos têm expressões ainda menores de HLA-DR em monócitos do sangue periférico quando evoluem com sepse.

Embora outros estudos sejam necessários para confirmar a tendência acima, parece-nos provável que os valores médios de expressão monocitária de HLA-DR que detectamos em cada subgrupo (ou valores muito próximos) possam vir a se revelar como bons parâmetros para permitir a distinção entre imunossenescência e efeitos secundários da sepse (imunoparalisia). Em consonância, ao realizarmos a curva ROC para o mHLA-DR, obtivemos o ponto de corte (*cutoff*) de 7.052 m/c (AUC 0,838; $p < 0,001$) como o parâmetro com a melhor combinação de sensibilidade e especificidade para discriminar entre as alterações devidas a imunossenescência e aquelas atribuíveis à imunoparalisia – esses resultados não mudaram significativamente quando a análise foi repetida considerando apenas indivíduos idosos saudáveis e pacientes idosos sépticos.

As expressões moleculares de CD64 em monócitos foram realizadas para permitir-nos uma observação mais ampla, em termos fenotípicos e funcionais, do sistema imune inato de todos os indivíduos estudados. Relatos quanto aos efeitos do envelhecimento ou da sepse sobre esse biomarcador são escassos. Parece lógico, dado o significado da molécula (FcγR1), que maiores expressões de CD64 em monócitos levariam a incrementos na sua atividade fagocítica, fato confirmado por estudos em voluntários (não-sépticos) em que a administração de fator estimulador do crescimento de granulócitos (G-CSF, do inglês *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) foi associada com maior atividade fagocítica (159). Há muito tempo, foi demonstrado que, em indivíduos idosos, a citotoxicidade celular dependente de anticorpos desempenhada por monócitos do sangue humano é reduzida (160).

Quanto aos domínios da sepse, ainda não está claro se a supra-regulação da expressão de antígenos CD64 em granulócitos e monócitos do sangue periférico se encontra associada a uma função fagocítica aumentada, uma vez que os estudos já realizados sobre esse biomarcador produziram resultados conflitantes (161). Hirsh *et al* (122) observaram que o aumento das taxas de expressão de CD64 em monócitos encontrava-se associado a disfunção leucocitária, enquanto que outros autores demonstraram que tais incrementos se relacionavam com atividade fagocítica aumentada em pacientes sépticos (161,162). É provável que, de alguma forma ainda não inteiramente compreendida, elevadas expressões de CD64 em neutrófilos e monócitos se correlacionem a uma atividade fagocítica mais intensa e, provavelmente, menores taxas de

letalidade em pacientes sépticos (161). Contudo, mesmo parecendo lógica tal conclusão, altas expressões de CD64 em granulócitos de pacientes sépticos se associaram a evoluções clínicas desfavoráveis em outro estudo (163). Ou seja, até maiores estudos permitirem uma correta definição do exato significado das variações de expressão de CD64 em fagócitos de pacientes sépticos, a controvérsia continuará.

Entre os três grupos que estudamos (idosos saudáveis, voluntários de meia-idade saudáveis e pacientes sépticos), a mediana mais elevada da expressão de CD64 em monócitos foi observada nos pacientes sépticos, o que está em concordância com os achados de outros autores, que revelaram que as expressões de tal antígeno encontram-se elevadas nos monócitos e/ou neutrófilos do sangue periférico de pacientes sépticos. Mesmo quando a expressão de tal antígeno em pacientes sépticos foi comparada à expressão de todos os 47 indivíduos saudáveis (idosos e de meia-idade), a mediana neste grupo reunido era significativamente menor (5.160 m/c [IQR 3.715 – 7.709]) do que nos pacientes sépticos (14.332 [IQR 10.108 – 38.426]; p = 0,001). O valor de *cutoff* com ótima combinação de sensibilidade e especificidade para separar a expressão de CD64 de pacientes sépticos e controles adultos saudáveis foi 9.680 m/c (AUC 0,785; p = 0,003).

Como já exposto, de forma similar ao que vimos quanto à expressão de HLA-DR, também observamos uma correlação negativa entre idade e expressão de CD64 (coeficiente r de Pearson =-0,61; p < 0,001). Dessa forma, especulamos que nós, seres humanos, aumentamos nossas expressões de CD64 em monócitos durante o insulto séptico, talvez numa tentativa de alterar o comportamento de nosso sistema imune de um fenótipo adequado a apresentação de antígenos para outro mais apropriado a um sistema imune adaptativo ativado, algo que é normalmente esperado que ocorra. Esse estudo não foi desenhado, porém, para produzir informações ou hipóteses acerca de sobrevida, e o tamanho reduzido da amostra de pacientes sépticos arrolados impediu-nos de chegar a qualquer conclusão sobre esse ponto.

Um dos pontos mais relevantes do presente estudo foi termos procedido uma análise quantitativa da expressão de HLA-DR e CD64. Avaliações quantitativas parecem ser um melhor meio de avaliar o real impacto prognosticador de biomarcadores expressos na superfície celular, uma vez que estudos restritos à definição das porcentagens de células (ou subtipos celulares) expressando determinado marcador podem conduzir a interpretações equivocadas – uma maior porcentagem de células expressando baixas quantidades de um antígeno não necessariamente significa que suas contagens absolutas (no mesmo volume de sangue) são mais elevadas do que sua expressão em menores porcentagens de células (uma limitação implícita do método semiquantitativo utilizado em grande parte dos trabalhos publicados). Provavelmente

em função da significativa variabilidade entre as metodologias aplicadas na investigação da expressão de antígenos de superfície, os resultados publicados venham sendo conflitantes. No terreno da imunossenescência, por exemplo, embora uma expressão reduzida de mHLA-DR já tenha sido descrita em indivíduos idosos saudáveis, sendo inclusive proposta como marcador da condição (imunossenescência) (90), dois outros estudos não foram capazes de detectar alterações em tal biomarcador (91,92); como hipótese explicativa, há que se considerar que um dos trabalhos aplicou uma metodologia quantitativa não-padronizada, desenvolvida na própria instituição e sem reprodução em outros centros (92). Dessa forma, considerando que as metodologias aplicadas são diferentes – até porque a metodologia quantitativa padronizada aplicada em nosso estudo apenas tornou-se disponível mais recentemente (164,165) –, quaisquer comparações podem ser fadadas ao erro.

Assim, uma estimativa da expressão média por célula permite uma observação mais precisa da realidade. Uma elevada expressão de HLA-DR na superfície celular das células apresentadoras de antígeno é considerado um marcador da imunocompetência inata (101) – um estudo inicial utilizando a técnica Quantibrite estabeleceu o valor de 15.000 m/c como o limite inferior normal da expressão de mHLA-DR em indivíduos saudáveis (164) –, enquanto que, na sepse, uma expressão reduzida é a característica marcante da imunoparalisia (165). Em consonância com essa importante visão, Poehlman *et al* (165), em seu estudo sobre as alterações fenotípicas e distúrbios funcionais de subtipos de células dendríticas em pacientes sépticos, reconheceram a presença de imunoparalisia através da demonstração de contagens monocitárias de HLA-DR inferiores a 5.000 antígenos por célula, mesmo parâmetro aceito por Döcke *et al* (166). Também utilizando o método Quantibrite, outro grupo propôs o ponto de corte de 5.725 m/c como o parâmetro capaz de identificar a presença de sepse com culturas positivas em pacientes em pós-operatório cardíaco (164). Um artigo mais recente demonstrou medianas de 4.354 m/c para pacientes sépticos sem choque cardiocirculatório e de 2.076, naqueles com choque séptico (167). Similarmente, em nosso estudo, encontramos uma expressão de mHLA-DR reduzida na fase inicial da sepse, cursando com uma mediana equivalente (4.526 m/c).

Embora permaneça desconhecida a exata razão porque monócitos de pacientes sépticos regulam para menos suas expressões de HLA-DR, diversas tentativas de explicação têm sido sugeridas. Payen *et al* (43) sugeriram que tal alteração poderia ser mais provavelmente devida a uma regulação pré-transcripciona (expressão diminuída do ativador de transcripção classe II [CIITA], uma via ligada à regulação da expressão de genes MHC induzida por interferonγ [43,101,168,169]) e/ou um profundo comprometimento bioenergético levando a um reduzido

turnover protéico (170,171), mas outras hipóteses tais como uma auto-regulação para indução de tolerância (para evitar um estado hiper-inflamatório [172]), reprogramação celular no sentido de um fenótipo migratório (permitindo que os antígenos sejam carreados até as células do sistema imune adaptativo nos órgãos linfóides [173,174] – num processo similar ao apontado acima para a regulação da expressão de CD64) e mecanismos pós-transcripcionais (relacionados com mediadores antiinflamatórios plasmáticos [172,175]) também têm sido sugeridos.

No que tange a imunossenescência, uma menor expressão de antígenos MHC classe II em monócitos (e macrófagos) parece ser devida a produções reduzidas de fatores de transcrição. Herrero *et al* (101) sustentaram a visão de que os efeitos do envelhecimento sobre a transcrição dos genes relacionados aos antígenos MHC classe II são especificamente devidos a quantidades reduzidas dos fatores de transcrição que se ligam aos *boxes* (receptores) W, X e Y, os três elementos *cis*-atuantes localizados próximo ao sítio de início da transcrição gênica que regulam a transcrição de tais genes, e não uma consequência direta de um prejuízo geral na ativação dependente de interferonγ de macrófagos. Além disso, diversos relatos sobre imunossenescência sugerem que o declínio nas funções imunes visto na condição (isto é, relacionado ao envelhecimento) é devido às atividades diminuídas de diversos genes que controlam essas funções, como aqueles que codificam IL-2, receptor de IL-2, interferonγ e IL-3 (101,176-179).

Outro ponto importante a considerar sempre que se consideram os efeitos do envelhecimento sobre determinado órgão ou sistema é a heterogeneidade do fenômeno chamado envelhecimento. Embora genericamente caracterizado por um processo de deterioração progressiva das funções e capacidades dos órgãos e sistemas humanos – o envelhecimento é um processo complexo que afeta uma ampla variedade de funções fisiológicas –, existe uma significativa variação no grau de limitações funcionais observadas em cada paciente idoso, tornando-o suscetível em maior ou menor grau ao desenvolvimento de condições mórbidas (como a sepse).

Apesar disso, com freqüência, de forma inconsciente e intuitiva, os médicos são capazes de identificar dentre os idosos, aqueles mais vulneráveis e com maior probabilidade de morrer. Este estado, atualmente denominado fragilidade do idoso, escapa à ênfase da medicina em alocar sintomas a uma doença específica, geralmente de um único sistema orgânico. A fragilidade é uma condição clínica pleomórfica, caracterizada por uma diminuição da reserva fisiológica, que aumenta a vulnerabilidade do organismo e, ao mesmo tempo, limita a capacidade de retorno à homeostase em situações de estresse. Ela é resultante de um acúmulo

de condições clínicas e sub-clínicas, crônicas e/ou agudas, que se associam a uma gama de distúrbios comportamentais e cognitivos e que tornam o paciente idoso mais vulnerável a diversos estresses orgânicos.

Evidentemente, esse estado de susceptibilidade do paciente frágil não apresenta um perfil dicotômico, existindo, em verdade, um espectro de variação de idosos independentes, ativos e resistentes (robustos), até aqueles extremamente frágeis e, portanto, vulneráveis.

Assim, uma pergunta pendente ao longo do presente estudo foi (e talvez persista!): "afinal, sobre que paciente idoso estamos falando (e estudando)?" (Estaríamos falando sobre idosos frágeis, quase-frágeis ou razoavelmente saudáveis?)

Para avaliar a fragilidade dos controles idosos do presente estudo, utilizamos o conceito que, atualmente, apresenta maior difusão, o proposto por Fried *et al* (180). Segundo tais autores, a fragilidade representaria um estado de vulnerabilidade fisiológica, relacionada à idade, produzida por uma reserva homeostática debilitada e uma capacidade reduzida do organismo de enfrentar situações de estresse. O grupo de Fried validou um conjunto de cinco variáveis associadas ao chamado *fenótipo de fragilidade* (180), que mostrou-se capaz de identificar idosos com risco elevado de desenvolver eventos adversos. Este declínio na reserva funcional ocorre em múltiplos sistemas fisiológicos, mas as alterações neuromusculares são centrais na chamada Síndrome de Fragilidade e resultam em sarcopenia, distúrbio na regulação neuro-endócrina e disfunção imunológica.

Os indivíduos idosos saudáveis analisados no presente projeto foram selecionados segundo o protocolo SENIEUR (apenas com a transgressão de também incluirmos indivíduos entre 65 e 70 anos de idade) e submetidos a uma estimativa quanto aos indicadores de Fried (180,181). Observamos uma reunião de indivíduos presumivelmente frágeis e relativamente saudáveis (portadores de patologias crônicas benignas, com maior ou menor grau de limitação, mas sem preenchimento de critérios para fragilidade), em que apenas não estavam presentes evidências de infecção, doenças inflamatórias crônicas, disfunções orgânicas importantes, neoplasias malignas avançadas, imunodepressão e/ou imunossupressão. Essa amostra pareceu-nos mais ilustrativa do real impacto do fenômeno da senescência – entendido como envelhecimento normal ou "quase normal" – sobre o sistema imune. Se assim não fosse, provavelmente estaríamos falando do comportamento do sistema imune dos idosos frágeis, de centenários e demais indivíduos submetidos a um envelhecimento com êxito (nonagenários, octagenários, etc) ou de qualquer grupo particular de idosos, e não da maioria dos pacientes idosos que porventura desencadeiam processos sépticos.

Em razão dos resultados obtidos nessa amostra em particular, podemos apenas especular sobre o impacto funcional da observada redução idade-dependente na expressão de mHLA-DR. Dados os critérios de exclusão e a reunião de uma parcela significativa de idosos não-frágeis, é clinicamente improvável a hipótese de que a redução na expressão de mHLA-DR seja um marcador de fragilidade ou de predisposição ao adoecimento. Nossos achados também falam contra a hipótese original de *inflamm-aging* (107), ajustando-se melhor à teoria revisada, segundo a qual um envelhecimento exitoso e robusto envolve o desenvolvimento de alguma atividade de rebote antiinflamatória (108). Em concordância com essa visão, é possível que a exclusão de indivíduos inflamados (com doenças auto-imunes, por exemplo) e a resultante seleção de indivíduos cujos envelhecimentos se deram em relativa saúde produziram, em nosso estudo, vieses no sentido de um fenótipo antiinflamatório.

A correlação significativa entre as expressões de HLA-DR e CD64 em monócitos nos indivíduos idosos saudáveis arrolados no presente estudo ($r = 0,74$; $p < 0,001$) sugere a presença de múltiplos mecanismos fisiológicos concurrentes, apesar de inúmeros biomarcadores (interleucinas, interferons, fatores de crescimento, hormônios e outras moléculas) estarem envolvidos e possuírem frequentemente efeitos antagônicos. Em consonância, apesar de os efeitos da sepse terem sido antagônicos sobre as expressões monocitárias de HLA-DR (diminuídas) e CD64 (aumentadas), ainda foi possível detectar uma correlação positiva significativa (apesar de mais fraca; $r = 0,62$; $p < 0,05$) entre idade e expressões moleculares de tais biomarcadores nos pacientes sépticos – isto é, os níveis de CD64 eram mais elevados nos pacientes que possuíam maiores expressões de mHLA-DR, possivelmente indicando uma maior reserva ou capacidade do sistema imune para reagir ao estresse infeccioso (figura 4B do artigo 2).

Finalmente, podemos – e devemos! – refletir sobre quais contribuições a presente tese pode representar no estudo da interseção entre sepse e imunossenescência, e para quais novos rumos (ou campos do saber científico) ela aponta. Em primeiro lugar, provavelmente a contribuição mais relevante do presente estudo é a definição de um limiar discriminatório entre os efeitos da imunossenescência e da imunoparalisia da sepse, com base nos achados da expressão de dois biomarcadores (HLA-DR e CD64) à citometria de fluxo. Para tanto, dada uma razoável superposição das expressões quantitativas de ambos marcadores entre indivíduos idosos saudáveis e pacientes sépticos, curvas ROC foram geradas para permitir o cálculo de valores de *cutoff* (para ambos marcadores) que permitissem a distinção entre alterações associadas ao envelhecimento e respostas do sistema imune inato associadas ao fenótipo da imunoparalisia da sepse. Um valor arredondado de *cutoff* de 9.700 m/c para mCD64 e de 7.000

m/c para mHLA-DR forneceram as melhores combinações de sensibilidade e especificidade para a discriminação entre as condições. Embora, não exista um valor de referência estabelecido para o mCD64, o nível de corte do mHLA-DR (com metodologia Quantibrite) encontra-se bem abaixo do limite inferior previamente estabelecido como normal e próximo ao limite proposto para definição da imunoparalisia (< 5.000 m/c [165,166]).

Em segundo lugar, parece-nos cada vez mais evidente que a heterogeneidade do comportamento imunológico dos pacientes sépticos, particularmente em torno da dualidade SIRS *versus* CARS, certamente culminará no indispensável desenvolvimento de um modelo multivariado que seja suficientemente sensível e específico na capacidade de reconhecer o comportamento dominante do sistema imune em cada momento em particular, durante a evolução clínica de cada paciente. Provavelmente, uma segunda versão do sistema PIRO, aprimorada pela inclusão de variáveis imunológicas – como expressão de HLA-DR e CD64 em monócitos ou outros marcadores integrativos de imunocompetência – resultará num modelo prático preditor de escolhas terapêuticas à beira do leito. Esse fascinante campo de pesquisa motiva-nos a prosseguir em uma provável extensão do presente trabalho.

A terceira conseqüência imediata da presente pesquisa relaciona-se à inegável necessidade de intervenções sobre a realidade vigente em nosso hospital universitário, particularmente no que tange aos obstáculos identificados para a efetiva implementação das recomendações estabelecidas pela *Surviving Sepsis Campaign*. Se nem todas as intervenções relacionadas podem, em curto prazo, ser colocadas em prática, pelo menos devemos buscar conscientizar a comunidade de assistência do HUPE no sentido de otimizarmos a velocidade de aplicação de intervenções de custo relativamente baixo, como o protocolo de ressuscitação volêmica e a antibioticoterapia precoce adequada.

Por fim, como idosos saudáveis são a exceção, não a regra, pecisaremos examinar o perfil dos biomarcadores analisados em idosos frágeis, portadores de uma elevada carga de doenças crônicas, uma vez que é exatamente esse grupo o segmento da população cujas taxas de internação em UTIs crescem mais rapidamente. No momento, já está programada uma extensão do presente estudo direcionada a avaliar o comportamento imunológico em idosos frágeis. As particularidades clínicas dos pacientes idosos sépticos tornar-se-ão cada vez mais reconhecidas, seja em seu estado imune, seja no grau de sua incapacidade crônica.

VI. CONCLUSÕES

- Encontramos uma elevada incidência de sepse num grande hospital universitário de um país de

médio aporte de recursos econômicos, que já passou pela transição demográfica;

- Demonstramos uma forte associação entre sepse e a existência de comorbidades crônicas;
- Identificamos vários obstáculos à efetiva implementação das recomendações da *Surviving Sepsis Campaign* para um manejo otimizado da sepse, como:
    - Dificuldades na rápida identificação/reconhecimento dos pacientes sépticos – limitando nossa capacidade de otimizar a ressuscitação volêmica e o início rápido da antibioticoterapia;
    - Indisponibilidade da dosagem dos níveis arteriais de lactato ou outros biomarcadores do estado da perfusão tissular;
    - Escassez de leitos de terapia intensiva, determinando que o tratamento de pacientes críticos seja mantido nas enfermarias do hospital;
    - Elevada gravidade dos quadros de sepse, havendo, em relação à maioria dos estudos epidemiológicos relevantes, uma maior proporção de pacientes com sepse severa e choque séptico;
    - Elevada prevalência de patógenos do grupo ESKAPE, que é composto por agentes com alta probabilidade de portarem padrões de resistência múltipla a antibióticos.
- Embora, em um curto prazo, não antecipemos uma solução para alguns desses problemas, outros poderão provavelmente ser resolvidos com alterações organizacionais relativamente simples;
- Observamos correlações negativas, estatisticamente significativas e em intensidade moderada, entre idade e intensidade de expressão molecular de HLA-DR ($r = -0,62$; $p < 0,001$) e CD64 ($r = -0,61$; $p < 0,001$) em monócitos de voluntários saudáveis (idosos e adultos de meia-dade);
- Durante a sepse, as expressões de mHLA-DR e de mCD64 alteraram-se significativamente:
    - A expressão de mHLA-DR foi ainda mais reduzida – a mediana da expressão de mHLA-DR nos pacientes sépticos (4.526 m/c [IQR 3.292 – 10.131]) foi menor que nos controles idosos (11.614 m/c [IQR 9.154 – 19.556]; $p < 0,01$) e nos controles adultos de meia-idade (25.182 m/c [IQR 16.526 – 34.850]; $p < 0,001$);
    - A expressão de mCD64 foi supra-regulada – a mediana da expressão de mCD64 nos pacientes sépticos idosos foi maior do que no grupo agregando todos os pacientes não-sépticos (14.332 m/c [IQR 10.108 – 38.426] *versus* 5.160 m/c [IQR 3.715 – 7.709]; $p < 0,01$), incluindo apenas os idosos relativamente saudáveis (4.778 [IQR 3.321 – 7.007]; $p < 0,001$).
- Constatamos que um valor arredondado de *cutoff* de 7.000 m/c para mHLA-DR forneceu a

melhor combinação de sensibilidade e especificidade para a discriminação entre imunossenescência e imunoparalisia da sepse;

- Observados que um valor arredondado de *cutoff* de 9.700 m/c para mCD64 forneceu a melhor combinação de sensibilidade e especificidade para a detecção da sepse em idosos;
- Embora mais estudos sejam certamente necessários para confirmar tais achados sobre a nossa capacidade de distinguir, através do comportamento de biomarcadores, entre a senescência do sistema imune e os efeitos da sepse (incluindo seu impacto na conduta e prognóstico), julgamos provável supor que poderemos atingir um estado tal de conhecimento em que, com base em parâmetros estabelecidos e validados de intensidade de expressão de biomarcadores obtidos à beira do leito, poderemos ter uma eficiente noção do *status* de funcionamento do sistema imune de cada paciente em particular, discriminando com segurança inflamação de anti-inflamação e imunossenescência de imunoparalisia;
- Conhecer o padrão normal da expressão de biomarcadores (como mHLA-DR e mCD64) em cada faixa etária (como indivíduos idosos sob risco de desenvolvimento de sepse) representa lidar com grupos de pacientes mais homogêneos, podendo tratamentos específicos ser particularizados em sintonia com suas reais necessidades, em termos de comportamento imune – passando os reais impactos de tais tratamentos a ser melhor definidos;
    - Nesse momento, não mais cometeremos erros de ministrar tratamentos antiinflamatórios a indivíduos imunossuprimidos, nem chegaremos a conclusões indevidas por não selecionarmos corretamente o momento adequado para cada intervenção.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Hotchkiss RS, Karl IE. Medical Progress: The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. N Engl J Med. 2003; 348(2):138-150.
2. Bone RC. The sepsis syndrome. Definition and general approach to management. Clin Chest Med. 1996; 17: 175-81

3. Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). Ann Int Med. 1996: 125: 680-7.
4. Randow F, Syrbe U, Meisel C, Krausch D, Zuckermann H, Platzer C, *et al*. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor β. J Exp Med. 1995; 181: 1887-1892.
5. Carvalho JL. Análise citofluorimétrica de características funcionais e expressão quantitativa de HLA-DR e CD64 em fagócitos na sepse grave [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Mestrado em Medicina (Nefrologia); 2003
6. Federal Interagency Forum on Aging-Related Statistics. Older American 2000: Key indicators of well- being. In www.agingstats.gov
7. Jakob SM, Rothen HU. Intensive care 1980-1995: change in patient characteristics, nursing workload and outcome. Intensive Care Med. 1997;23:1165-70
8. Chelluri L, Grenvik A, Silverstein M. Intensive care for critically ill elderly: mortality, costs, and quality of life. Review of the literarture. Arch Intern Med. 1995;155:1013-22
9. Angus DC, Kelly MA, Schimdt RJ, White A, Popovich J, for the Committee on Manpower for Pulmonary and Critical Care Societies (COMPACCS). Current and projected work-force requirements for care of the critically ill and patients with pulmonary disease: can we meet the requirements of an aging population? JAMA. 2000;284:2762-2770
10. Tarazona R, Solana R, Ouyang Q, Pawelec G. Basic biology and clinical impact of immunosenescence. Exper Gerontol. 2002; 37:183-9.
11. Silva E, Pedro Mde A, Sogayar ACB *et al*. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). Crit Care. 2004; 8:R251-R260.
12. Sales Jr JAL, David CM, Hatum R *et al*. Sepse Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepse em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. Rev Bras Ter Intensiva. 2006; 18(1):9-17.
13. Sogayar AMC, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grion C, Lobo SM, *et al*; The Costs Study Group – Latin American Sepsis Institute. COSTS – multicenter, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. Pharmacoeconomics. 2008;26:425-34
14. Beale R, Reinhart K, Dobb G, Silva E, LeClerc J, Basson B, *et al*. PROGRESS (Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis): a preliminary report of an internet-based sepsis registry. Chest. 2003; 124:224
15. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, *et al*. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992; 101: 1644-55
16. Angus DC, Waz RS. Epidemiology of sepsis: an update. Crit Care Med. 2001; 29: S109-16
17. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. JAMA. 1995; 273: 117-23
18. Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. Intensive Care Med. 2000; 26 (suppl 1): S64-74
19. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, *et al*. For the International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med. 2003;31:1250-56
20. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med. 2003; 348:1546-54
21. Increase in national Hospital Discharge Survey rates for septicemia – United States, 1979-1987. MMWR (Morb Mortal Wkly Rep)

22. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med. 2001; 29: 1303-10
23. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, *et al*. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicenter cohort study. Intensive Care Med. 2002; 28:108-121.

24. Annane D, Aegerter P, Jatrs-Guincestre MC, Guidetfor B. Current Epidemiolgy of septic shock: The CUB-Réa Network. Am J Respir Crit Care Med. 2003; 168:165-172.
25. Kreger BE, Craven DE, McCabe WR. Gram-negative bacteremia. Re-evaluation of clinical features and treatment in 612 patients. Am J Med. 1980; 68: 344-55
26. Astiz ME, Rackow EC. Septic shock. Lancet. 1998; 351: 1501-5
27. Cohen J. Novel forms of therapy for sepsis: A critical review, in *Critical Care Symposium* 1996, edited by Society of Critical Care Medicine, New Orleans, 1996, pp 59-79
28. Abraham E. Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis. Intensive Care Med. 1999; 25: 556-66
29. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. Shock. 2001; 16: 83-96
30. Pinsky MR. Sepsis: a pro and anti-inflammatory disequilibrium syndrome. Contrib Nephrol. 2001; 13: 354-66
31. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, *et al*. Early-goal directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. N Engl J Med. 2001; 345:1368-77
32. Bernard GR, Vincent J, Laterre P, *et al*. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. N Engl J Med. 2001; 344:699-709
33. Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, *et al*. Intensive insulin therapy in critically ill patients. N Engl J Med. 2001; 345:1359-67
34. Annane D, Sébille V, Charpentier C, *et al*. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. JAMA. 2002; 288:862-71
35. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med. 2000; 342:1301-8
36. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, *et al*. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. Crit Care Med. 2004; 32(3):858-73
37. Munoz C, Carlet J, Fitting VC, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. J Clin Invest. 1991; 88; 1747-54
38. Kupper TS, Deitch EA, Baker CC, Wong WC. The human burn wound as a primary source of interleukin-1 activity. Surgery. 1986; 100: 409-15
39. Puren AJ, Feldman C, Savage N, Becker PJ, Smith C. Patterns of cytokine expression in community-acquired pneumonia. Chest. 1995; 107: 1342-9
40. Tracey KJ, Lowry SF, Cerami A. Cachetin/TNF-alpha in septic shock and septic adult respiratory distress syndrome. Am Rev Respir Dis. 1988; 17: 1377-9
41. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. Ann Intern Med. 1991; 115: 457-69
42. Van der Poll T, Opai SM. Host-pathogen interactions in sepsis. Lancet Infect Dis. 2008; 8:32-43
43. Payen D, Faivre V, Lukaszewicz AC, Villa F, Goldberg P. Expression of monocyte human leukocyte antigen-DR in relation with sepsis severity and plasma mediators. Minerva Anestesiol. 2009; 75(9):484-93

44. Petrak RA, Balk RA, Bone RC. Prostaglandins, cyclo-oxygenase inhibitors and thromboxane synthetase inhibitors in the pathogenesis of multiple systems organ failure. Crit Care Clin. 1989; 5: 303-14
45. Sigurdsson GH, Christenson JT, el-Rakshy MB, Sadek S. Intestinal platelet trapping after traumatic and septic shock. An early sign of sepsis and multiorgan failure in critically ill patients? JAMA. 1992; 20: 458-67
46. Cipolle MD, Pasquale MD, Cerra FB. Secondary organ dysfunction. From clinical perspectives to molecular mediators. Crit Care Clin. 1993; 9: 261-98
47. Levi M, ten Cate H, van der Poll T, van Deventer SJ. Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. JAMA. 1993; 270: 975-9
48. Gomez-Jimenez J, Salgado A, Mourelle M, Martin Mc, Segura RM, Peracaula R, *et al*. L-arginine: nitric oxide pathway in endotoxemia and human septic shock. Crit Care Med. 1995; 23: 253-8
49. Miyauchi T, Tomobe Y, Shiba R, Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, *et al*. Involvement of endothelin in the regulation of human vascular tonus. Potent vasoconstrictor effect and existence in endothelial cells. Circulation. 1990; 81: 1874-80
50. Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. Chest. 1993; 103: 565-75
51. Fisher CJ Jr, Opal SM, Dhainaut JF, Stephens S, Zimmerman JL, Nightingale P *et al*. Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. The CB 0006 Sepsis Syndrome Study Group. Crit Care Med. 1993; 21: 318-27
52. Dofferhoff AS, Bom VJ, de Vries-Hospers HG, van Ingen J, Meer VD, Hazenber BP, *et al*. Patterns of cytokines, plasma endotoxin, plasminogen activator inhibitor and acute-phase proteins during the treatment of sepsis in humans. Crit Care Med. 1992; 20: 185-92
53. Leser HG, Gross V, Scheibenbogen C, Heinisch A, Salm R, Lalusen M, *et al*. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. Gastroenterology. 1991; 101: 782-5
54. Mills CD, Caldwell MD, Gann DS. Evidence of a plasma-mediated "window" of immunodeficiency in rats following trauma. J Clin Immunol. 1989; 9: 139-50
55. Faist E, Storck M, Hultner L, Redl H, Eertel W, Walz A, *et al*. Functional analysis of monocyte activity through synthesis patterns of proinflammatory cytokines and neopterin in patients in surgical intensive care. Surgery. 1992; 112: 562-72
56. Syrbe U, Meinecke A, Platzer C, Makki A, Asadullah K, Klug C, *et al*. Improvement of monocyte function – a new therapeutic approach? In: Reinhart K, Eyrich K, Sprung CL, editores. Sepsis: Current Perspectives in Pathophysiology and Therapy. Berlin: Springer-Verlag 1994: pp: 473-500
57. Spear GT, June RA, Landay AL. Oxidative burst capability of human monocyte subsets defined by high and low HLA-DR expression. Immunol Invest. 1989; 18: 993-1005
58. Cheadle WG, Hershman MJ, Welhausen SR, Polk HC. HLA-DR antigen expression on peripheral blood monocytes correlates with surgical infection. Am J Surg. 1991; 161: 639-45
59. Volk HD, Thieme M, Heym S, Docke WD, Ruppe U, Tausch W, *et al*. Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease – predictive value and new therapeutic strategies. Behring Inst Mitt. 1991; 208-15
60. Lin RY, Astiz ME, Saxon JC, Rackow EC. Altered leukocyte immunophenotypes in septic shock. Studies of HLA-DR, CD 11b, CD 14 and IL-2R expression. Chest. 1993; 104: 847-53
61. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS and CARS. Crit Care Med. 1996; 24: 1125-8

62. Asadullah K, Woiciechowsky C, Docke WD, Egerer K, Kox WJ, Vogel S, *et al*. Very low monocytic HLA-DR expression indicates high risk of infection – immunomonitoring for patients after neurosurgery and patients during high dose steroid therapy. Eur J Emerg Med. 1995; 2: 184-190

63. Docke WD, Syrbe U, Meineck A, Platze RC, Makki A, AsadullahH K, *et al*. Improvement of monocyte function – a new therapeutic approach? In *Sepsis: Current Perpectives in Pathophysiology and Therapy* (vol 18) edited by Reinhart K, Eyrich K, Sprung CL, Berlin, Springer-Verlag 1994, pp 473-500

64. Chantry D, Turner M, Abney E, Feldmann M. Modulation of cytokine production by transforming growth factor beta. J Immunol. 1989; 142: 4295-300

65. de Waal MR, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, teVelde A, Figdor C, *et al*. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down-regulation of class II major histocompatibility complex expression. J Exp Med. 1991; 174: 915-24

66. Espevick T, Figari IS, Shalaby MR, Lackides GA, Lewis GD, Shepard HM, *et al*. Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor beta. J Exp Med. 1987; 166: 571-6

67. Czarnieck CW, Chiu HH, Wong GH, McCabe SM, Palladino MA. Transforming growth factor beta-1 modulates the expression of class II histocompatibility antigens on human cells. J Immunol. 1988; 140: 4217-23

68. Ayala A, Herdon CD, Lehman DL, Ayala CA, Chaudry IH. Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency and the nature of the mediators. Blood. 1996; 87: 4261-75

69. Heidecke CD, Hensler T, Weighardt H, Zanti N, Wagner H, Siewert Jr, *et al*. Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intra-abdominal infection. Am J Surg. 1999; 178: 288-92

70. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmieg RE Jr, Hui JJ, Chang KC, *et al*. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. J Immunol. 2001; 166: 6952-63

71. Green DR, Biiere HM. Apoptosis: gone but not forgotten. Nature. 2000; 405: 28-9

72. Voll RE, Herrmann M, Ropth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosupressive effects of apoptotic cells. Nature. 1997; 390: 350-1

73. Padok VA, Bratton DI, Rose DM, Pearso A, Ezekewitz RA, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearence of apoptotic cells. Nature. 2000; 405: 85-90

74. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Matuschak GM, Coob JP, *et al*. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. Crit Care Med. 1999; 27: 1230-51

75. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, *et al*. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. J Immunol. 2002; 168: 2493-500

76. Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Hui JJ, Klender P, *et al*. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. Nat Immunol. 2000 ; 1: 496-501

77. Chung CS, Xu YX, Wang W, Chaudry IH, Ayala H. Is Fas ligand or endotoxin responsible for mucosal lymphocyte apoptosis in sepsis? Arch Surg. 1998; 133: 1213-20

78. Platzer C, Meisel C, Vogt K, Platzer M, Volk HD. Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and c AMP elevating drugs. Int Immunol. 1995; 7: 517-23

79. Lehman AK, Halstensen A, Sornes S, Rokke O, Wage A. High levels of interleukin 10 in serum are associated with fatality in meningococcal disease. Infect Immun. 1995; 63: 2109-12

80. Tschaikowsky K, Hewdwig-Geissing M, Schiele A, Bremer F, Schywalsky M, Schüttler J. Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and postoperative patients. Crit Care Med. 2002; 30: 1015-23

81. Cannon JG, Freidberg JS, Gelfand JA, Tompkins RG, Burke JF, Dinarello CA. Circulating interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha concentrations after burn injury in humans. Crit Care Med. 1992; 20; 1414-9

82. Marano MA, Fong Y, Moldawer LL, Wei H, Calvano SE, Tracey KJ, *et al*. Serum cachectin/tumor necrosis factor in critically ill patients with burns correlates with infection and mortality. Surg Gynecol Obstet. 1990; 170: 32-8

83. Pos O, van der Stelt ME, Wolbink GJ, Nijsten MW, van der Tempel GL, van Dijik W. Changes in the serum concentration and the glycosylation of human alpha 1-acid glycoprotein and alpha 1-protease inhibitor in severely burned persons: relation to interleukin-6 levels. Clin Exp Immunol. 1990; 82: 579-82

84. Drela N, Kozdron E, Szczypiorski P. Moderate exercise may attenuate some aspects of immunosenescence. BMC Geriatrics. 2004; 4:8

85. Beverley PCL, Grubeck-Loebenstein B. Is Immune Senescence Reversible? Vaccine. 2000;18:1721-4

86. Thiers BH, Maize JG, Spice SS, Cantor AB. The effect of aging and chronic sun exposure on human Langerhans cell population. J Invest Dermatol. 1984;82:223-6

87. Nakahama M, Mohri N, Mori S, Shindo G, Yokoi Y, Machinami R. Immunohistochemical and histometrical studies of the human thymus with special emphasis on age-related changes in medullary epithelial and dendritic cells. Virchows Archiv. B. Cell Pathology. 1990;58:245-51

88. McLachlan JÁ, Serkin CD, Morrey KM, Bakouche O. Antitumoral properties of aged human monocytes. J Immunol. 1995;154:832-43

89. Yuan A, Baird MA. Changes in the frequency and function of rat spleen dendritic cells occur with age. Aging Immunol Infect Dis. 1994;5:121-32

90. Villanueva JL, Solana R, Alonso MC, Pena J. Changes in the expression of HLA-class II antigens on peripheral blood monocytes from aged humans. Dis Markers. 1990; 8:85-91

91. Rich EA, Mincek MA, Armitage KB, Duffy EG, Owen DC, Fayen JD, *et al*. Accessory function and properties of monocytes from healthy elderly humans for T lymphocyte responses to mitogen and antigen. Gerontology. 1993; 39:93-108

92. Le Morvan C, Cogné M, Troutaud D, Charmes JP, Sauvage P, Drouet M. Modification of HLA expression on peripheral lymphocytes and monocytes during ageing. Mech Ageing Dev. 1998; 105:209-20

93. Goldberg TH, Finkelstein MS. Diminished complement and elevated cortisol levels in sera from infected elderly patients. Aging Immunol Infect Dis. 1994;5:99-107

94. Bach MA. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: effect of aging, adult thymectomy and thymic factor. J Immunol. 1977;119:641-7

95. Weksler ME, Innes JB, Goldstein G. Immunological studies of aging. IV. The contribution of thymic involution to the immune deficiencies of aging and reversal with thymopoietin. J Exp Med. 1978;148:996-1006

96. Frasca D, Garavini M, Doria G. Recovery T cell functions in aged mice injected with synthetic thymosin a-1. Cellular Immunol. 1982;72:384-91

97. Ershler WB, Sun WH, Binkley N, *et al*. Interleukin 6 and aging: blood levels and mononuclear cell production increase with advancing age and in vitro production is modifiable by dietary restriction. Lymphokine Cytokine Research. 1993;12:225-30

98. Cakman I, Rohwer J, Schutz RM, Kirschner H, Rink L. Dysregulation between TH1 and TH2 T cell population in the elderly. Mech Ageing Dev. 1996;87:197-209
99. Malaguarnera L, Ferlito L, Imbesi RM, GuliziD, Malaguarnera M, Messina A. Immunosenescence: a review. Arch Gerontol Geriatr. 2001; 32:1-14
100. Monserrat J, De Pablo R, Reyes E, Diaz D, Barcenilla H, Zapata MR, *et al*. Clinical relevance of the severe abnormalities of the T cell compartment in septic shock patients. Crit Care. 2009; 13:R26
101. Herrero C, Sebastián C, Marqués L, Comalada M, Xaus J, Valledor AF, *et al*. Immunosenescence of macrophages: reduced MHC class II gene expression. Exp Gerontol. 2002; 37:389-94
102. Utsuyama M, Hirokawa K, Kurashima C, *et al*. Differential age-related changes in the number of CD4+CD45RA+ and CD4+CD29+ T cell subsets in human peripheral blood. Mech Ageing Dev. 1992;63:57-68
103. Zharhary D, Klinman NR. Antigen responsiveness of the mature and generative B cell population of aged mice. J Exp Med. 1983;157:1300-8
104. Borghesi C, Nicoletti C. Increase of cross (auto) reactive antibodies after immunization in aged mice – a cellular and molecular study. Int J Exp Pathol. 1994;75:123-30
105. Korsrud FR, Brnadzaeg P. Immune system of human nasopharyngeal and palatine tonsils: histomorphometry of lymphoid components and quantification of immunoglobulin-producing cells in health and disease. Clin Exp Immunol. 1980;39:361-70
106. Schmucker DL, Heyworth MF, Owe RL, Daniels CK. Impact of aging on gastrointestinal mucosal immunity. Digest Dis Sciences. 1996;41:1183-93
107. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, *et al*. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. Annals of the New York Academy of Sciences. 2000;908:244-54
108. Giunta S. Exploring the complex relations between inflammation and aging (inflamm-aging): Anti-inflamm-aging remodelling of inflamm-aging, from robustness to frailty. Inflamm Res. 2008;57:558-63
109. Reny JL, Vuagnat A, Ract C, Benoit MO, Safar M, Fagon JY. Diagnosis and follow-up of infections in intensive care patients: Value of C-reactive protein compared with other clinical and biological variables. Crit Care Med. 2002; 30: 529-35
110. Pettilä V, Pentti J, Pettilä M, Takkunen O, Jousela I. Predictive value of antithrombin III and serum C-reactive protein concentration in critically ill patients with suspected sepsis. Crit Care Med. 2002; 30: 271-5
111. Oberhoffer M, Karzai W, Meier–Hellmann A, Bögel D, Fassbinder J, Reinhart K. Sensitivity and specificity of various markers of inflammation for the prediction of tumor necrosis factor-α and interleukin-6 in patients with sepsis. Crit Care Med. 1999; 27: 1814-18
112. Claeys R, Vinken S, Spapen H, ver Elst k, Decochez K, Huyghens L, *et al*. Plasma procalcitonin and C-reactive protein in acute septic shock: Clinical and biological correlates. Crit Care Med. 2002; 30: 757-62
113. Lekkou A, Karakantza M, Mouzaki A, Kalfarentzos F, Gogos C. Cytokine production and monocyte HLA-DR expression as predictors of outcome for patients with community-acquired severe infections. Clin Diagn Lab Immunol. 2004; 11:161-7
114. McDunn JE, Hotchkiss RS. Leukocyte phenotyping to stratify septic shock patients. Crit Care. 2009; 13:127 (doi:10.1186/cc7748). Disponível em: http://ccforum.com/content/13/2/127
115. Dean PN. Current Protocols in Cytometry. 1997. Copyright by John Wiley &Sons, Inc

116. Parks DR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting, in Fundamental Immunological, Second edition 1989 edited by William E. Paul. Raven Press Ltd[a], New York, pp 781-802
117. Crawford RM, Leiby DA, Green SJ, Nacy CA, Fortier AH, Meltzer MS. Macrophage activation: a riddle of immunological resistance. Immunol Ser. 1994; 60: 29-46
118. Emmendörffer A, Hecht M, Lohmann-Matthes ML, Riesker J. A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. J Immunol Methods. 1990; 131: 269-75
119. Rothe G, Emmendörffer A, Oser A, Roesler J, Valet G. Flow cytometric measurement of the respiratory burst activity of phagocytes using dihydrorhodamine 123. J Immunol Methods. 1991; 138: 133-5
120.van Eeden S, Klut ME, Walker BAM, Hogg JC. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. J Immunol Methods. 1989; 232: 23-43
121. Perticarari S, Presani G, Mangiarotti MA, Banfi E. Simultaneous flow cytometric method to measure phagocytosis and oxidative produtcts by neutrophils. Cytometry. 1991; 12: 687-93
122. Richardson MP, Ayliffe MJ, Helbert M, Davies EG. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. J Immunol Methods. 1998; 219: 187-93
123. Barth E, Fischer G, Schneider EM, Wollmeyer J, Georgieff M, Wwiss M. Differences in the expression of CD64 and mCD14 on polymorphonuclear cells and on monocytes in patients with septic shock. Cytokine. 2001; 14: 299-302
124. Qureshi SS, Lewis SM, Gant VA, Treacher D, Davis BH, Brown KA. Increased distribution and expression of CD64 on blood polymorphonuclear cells from patients with the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). Clin Exp Immunol. 2001; 125(2): 258-65
125. Hirsh M, Mahamid E, Bashenko Y, Hirsh I, Krausz MM. Overexpression of the high-affinity Fc gamma receptor (CD64) is associated with leukocyte dysfunction in sepsis. Shock. 2001; 16: 102-8
126. Ng PC, Li K, Wong RP, Chui KM, Wong E, Fok TF. Neutrophil CD64 expression: a sensitive diagnostic marker for late-onset nosocomial infection in very low birthweight infants. Pediatr Res. 2002; 51: 296-303
127. Fischer G, Schneider EM, Moldawer LL, Karcher C, Barth E, Suger-Wiedeck H, *et al*. CD64 surface expression on neutrophils is transiently upregulated in patients with septic shock. Intensive Care Med. 2001; 27: 1848-52
128. Groselj-Grenc M, Ihan A, Derganc M. Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: comparison of fluorescence intensities and calculated indexes. Mediators Inflammation. 2008 (doi: 10.1155/2008/202646)
129. Linde-Zwirble WT, Angus DC. Severe sepsis epidemiology: sampling, selection and society. Crit Care. 2004; 8(4):222-226
130. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. Crit Care Med. 1985;13:818-29
131. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, *et al*. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. Intensive Care Med. 1996;22(7):707-10

132. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, *et al*. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. Intensive Care Med. 2004;30(4):580-588

133. Topeli A, Laghi F, Tobin MJ. Effect of closed unit policy and appointing an intensivist in a developing country. Crit Care Med. 2005;33(2):299-306

134. World Health Organization. Preventing chronic diseases: a vital investment — WHO global report. Geneva: World Health Organization; 2005

135. PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO. Apresenta o ranking de 182 países e territórios classificados segundo o Índice de Desenvolvimento Humano calculado com dados relativos a 2007. Disponível em: <HTTP://www.pnud.org.br/pobreza_desigualdade/reportagens/>. Acesso em: 08 out. 2009

136. Dawson B, Trapp RG. Bioestatística: básica e clínica. 3ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil; 2003

137. Howell MD, Donnino M, Clardy P, *et al*. Occult hypoperfusion and mortality in patients with suspected infection. Intensive Care Med. 2007;33(11):1892-1899

138. Bakker J, Gris P, Coffernils M, *et al*. Serial blood lactate levels can predict the development of multiple organ failure following septic shock. Am J Surg. 1996;171(2): 221-226

139. Gogos CA, Lekkou A, Papageorgiou O, *et al*. Clinical prognostic markers in patients with severe sepsis: a prospective analysis of 139 consecutive cases. J Infect. 2003;47(4): 300-306

140. Lee SW, Hong YS, Park DW, *et al*. Lactic acidosis not hyperlactatemia as a predictor of in hospital mortality in septic emergency patients. Emerg Med J. 2008;25(10):659-665

141. McGloin H, Adam SK, Singer M. Unexpected deaths and referrals to intensive care of patients on general wards. Are some cases potentially avoidable? J R Coll Physicians Lond. 1999;33(3):255-259

142. Carter C. Implementing the severe sepsis care bundles outside the ICU by outreach. Nurs Crit Care. 2007;12(5):225-230

143. Padkin A, Goldfrad C, Brady AR, *et al*. Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland. Crit Care Med. 2003;31(9):2332-2338

144. Busund R, Koukline V, Utrobin U, *et al*. Plasmapheresis in severe sepsis and septic shock: a prospective, randomised, controlled trial. Intensive Care Med. 2002;28(10): 1434-1439

145. Kubler A, Durek G, Zamirowska A, *et al*. Severe sepsis in Poland--results of internet surveillance of 1043 cases. Med Sci Monit. 2004;10(11):CR635-641

146. Angkasekwinai N, Rattanaumpawan P, Thamlikitkul V. Epidemiology of sepsis in Siriraj Hospital 2007. J Med Assoc Thai. 2009; 92 Suppl 2:S68-78

147. Tanriover MD, Guven GS, Sen D, *et al*. Epidemiology and outcome of sepsis in a tertiary-care hospital in a developing country. Epidemiol Infect. 2006;134(2):315-322

148. Jaimes F. A literature review of the epidemiology of sepsis in Latin America. Rev Panam Salud Publica. 2005;18(3):163-171

149. Blanco J, Muriel-Bombin A, Sagredo V, *et al*. Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. Crit Care. 2008;12(6):R158

150. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, *et al*. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. Intensive Care Med. 2007;33(4):606-18

151. Sundararajan V, Macisaac CM, Presneill JJ, *et al*. Epidemiology of sepsis in Victoria, Australia. Crit Care Med. 2005;33(1):71-80

152. Esteban A, Frutos-Vivar F, Ferguson ND, *et al*. Sepsis incidence and outcome: contrasting the intensive care unit with the hospital ward. Crit Care Med. 2007;35(5): 1284-1289
153. Harbarth S, Garbino J, Pugin J, *et al*. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. Am J Med. 2003;115(7):529-535
154. Sands KE, Bates DW, Lanken PN, *et al*. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. JAMA. 1997;278(3):234-240
155. Garnacho-Montero J, Garcia-Garmendia JL, Barrero-Almodovar A, *et al*. Impact of adequate empirical antibiotic therapy on the outcome of patients admitted to the intensive care unit with sepsis. Crit Care Med. 2003;31(12):2742-2751
156. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, *et al*. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. Crit Care Med. 2006;34(2):344-353
157. Adrie C, Francais A, Alvarez-Gonzalez A, *et al*. Model for predicting short-term mortality of severe sepsis. Crit Care. 2009;13(3):R72
158. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. J Infect Dis. 2008;197(8):1079-1081
159. Kerst JM, de Haas M, van der Schoot CE, *et al*. Recombinant granulocyte colony stimulating factor administration to healthy volunteers: induction of immunophenotypically and functionally altered neutrophils via an effect on myeloid progenitor cells. Blood. 1993; 82:3265-72
160.Fülöp T, Fóris G, Wórum I, Leövey A. Age-dependent changes of the Fc gamma-receptor-mediated functions of human monocytes. Int Arch Allergy Appl Immunol**.** 1984; 74(1):76–79
161. Danikas DD, Karakantza M, Theodorou GL, Sakellaropoulos GC, Gogos CA. Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and C14 antigen expression. Clin Exper Immunol. 2008; 154:87-97
162. Spittler A, Razenberger M, Kupper H, *et al*. Relationship between interleukin 6 plasma concentration in patients with sepsis, monocyte phenotype, monocyte phagocytic properties, and cytokine production. Clin Infect Dis. 2000; 31:1338-42
163. Livaditi O, Kotanidou A, Psarra A, Dimopoulou I, Sotiropoulou C**,** Augustatou K, *et al*. Neutrophil CD64 expression and serum IL-8: sensitive early markers of severity and outcome in sepsis. Cytokine. 2006; 36:283-90
164. Strohmeyer JC, Blume C, Meisel C, Doecke WD, Hummel M, Hoeflich C, Thiele K, Unbehaun A, Hetzer R, Volk HD. Standardized immune monitoring for the prediction of infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients. Cytometry B Clin Cytom. 2003;53:54-62
165. Poehlmann H, Schefold J, Zuckermann-Becker H, Volk HD, Meisel C. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. Crit Care. 2009; 13:R119
166.Döcke WD, Höflich C, Davis KA, Rottgers K, Meisel C, Kiefer P, *et al*. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic hla-dr expression: A multicenter standardized study. Clin Chem. 2005;51:2341-7
167. Lukaszewicz A-C, Grienay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre Vr, Boval B, Payen D. Monocytic hla-dr expression in intensive care patients: Interest for prognosis and secondary infection prediction. Critical Care Medicine. 2009;37:2746-52 2710.1097/ CCM.2740b2013e3181ab2858a
168. Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L, Guilloux V, Tribut O, Arvieux C, *et al*. Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional downregulation by cortisol during septic shock. Am J Respir Crit Care Med. 2004; 169:1144-51

169. Pachor A, Monneret G, Brion A, Vener F, Bohe J, Bienvenu J, *et al*. Messenger RNA expression of major histocompatibility complex class II genes in whole blood from septic shock patients. Crit Care Med. 2005; 33:31-8

170. Calvano SE, Xiao W, Richards DR, Feliciano RM, Baker HV, Cho RJ, *et al*. and The Inflammation and Host Response to Injury Large Scale Collaborative Research Program. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature.* 2005; 437:1032-7

171. Belikova I, Lukaszewicz AC, Faivre V, Damoisel C, Singer M, Payen D. Oxygen consumption of human peripheral blood mononuclear cells in severe human sepsis. Crit Care Med. 2007; 35:2702-8

172. Wolk K, Kunz S, Crompton NE, Volk HD, Sabat R. Multiple mechanisms of reduced major histocompatibility complex class II expression in endotoxin tolerance. J Biol Chem. 2003; 278:18030-6

173. Huang Q, Liu D, Majewski P, Schulte LC, Korn JM, Young RA, *et al*. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. Science. 2001; 294:870-5

174. Boldrick JC, Alizadeh AA, Diehn M, Dudoit S, Liu CL, Belcher CE, *et al*. Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99:972-7

175. Fumeaux T, Pugin J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. Am J Respir Crit Care Med. 2002; 166:1475-82

176. Wu WT, Pahlavani M, Cheung HT, Richardson A. The effect of aging on the expression of interleukin 2 messenger ribonucleic acid. Cell Immunol. 1986; 100:224-231

177. Nagel JE, Chopra RK, Chrest FJ, McCoy MT, Schneider HL, Holbrook NJ, *et al*. Decreased proliferation, interleukin 2 synthesis, and interleukin 2 receptor expression are accompanied by decreased mRNA expression in phytohemagglutinin-stimulated cells from elderly donors. J Clin Invest. 1988; 81:1096-1102

178. Gauchat JF, Walker C, De Weck AL, Stadler BM. Stimulation-dependent lymphokine mRNA levels on human mononuclear cells. Eur J Immunol. 1988; 18:1441-6

179. Li DD, Chien YK, Gu MZ, Richardson A, Cheung HT. The age-related decline in interleukin-3 expression in mice. Life Sci. 1988; 43:1215-22

180. Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, *et al* for The Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. J Gerontol Med Sci. 2001;56:M146-56

181. Ligthart GJ, Corberand JX, Fournier C, Galanaud P, Hiimans W, Kennes B, *et al*. Muller-Hermclink HK, Steinmann GG. Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. Mech Ageing Dev. 1984; 28: 47-55

ANEXO A

ANEXO B

NOME	GÊNERO	IDADE	ETNIA	HLA-DR monócitos	CD64 monócitos
TJA	FEM	65	B	14946	8070
SOS	FEM	65	B	11554	3321
HLA	MASC	65	N	10192	2990
LFS	FEM	66	B	22763	7574
MJSM	FEM	67	B	17403	7709

RVZ	FEM	68	B	4010	1795
MJA	FEM	68	B	12010	3851
LCS	FEM	69	N	8695	1461
EPF	MASC	69	B	19901	4244
OS	FEM	69	B	4929	4541
MJM	FEM	70	B	27552	7947
MATS	FEM	70	B	19556	3835
AP	MASC	70	B	10078	3873
ANM	FEM	71	PD	3344	2633
RGP	FEM	71	B	10718	2183
EL	MASC	71	B	26551	7007
EFS	MASC	71	B	13135	5010
WOS	FEM	72	B	19958	4778
MJOS	FEM	72	N	14205	5911
JJPA	MASC	72	PD	4062	5160
MGIS	FEM	74	B	44228	7998
JAA	MASC	75	B	5885	7047
CSV	FEM	78	PD	11614	4918
OS	MASC	81	B	9154	803
MFSO	FEM	83	B	15634	4951
HFAL	FEM	84	B	9614	5673
IMS	FEM	84	B	10273	4263

ANEXO C

NOME	GÊNERO	IDADE	ETNIA	HLA-DR monócitos	CD64 monócitos
MAC	MASC	36	B	38801	13037
MR	FEM	42	B	46695	21279
IMPA	FEM	42	B	33849	16826
E	FEM	42	B	20208	3715
JHRS	MASC	43	B	51259	16162

EG	FEM	43	B	37543	19357
R	FEM	44	B	31827	2834
RR	MASC	45	B	24936	11695
FM	MASC	47	B	18556	6756
BH	MASC	55	B	13314	1625
JFS	FEM	56	B	35184	11683
LCP	MASC	60	B	32173	7446
BAL	MASC	61	N	9290	5654
EGM	MASC	62	B	1843	1041
NFM	FEM	62	B	16424	4086
LMDA	FEM	62	B	19747	6474
RPV	MASC	62	N	29763	5240
NSS	FEM	62	N	13303	5634
MFD	FEM	64	B	25427	8144
DAE	FEM	64	B	16831	3548

ANEXO D

NOME	GÊNERO	IDADE	ETNIA	HLA-DR monócitos	CD64 monócitos
PSVB	MASC	62	B	18705	42625
KJP	MASC	75	B	4526	46088
DBC	FEM	70	B	3292	2185
GM	MASC	69	B	10131	29766

JD	MASC	73	B	6219	38426
TLS	FEM	97	B	20885	35176
LSS	FEM	68	B	1146	2327
FASR	MASC	84	B	3977	14332
MAC	MASC	29	B	2381	11369
JC	MASC	42	B	3947	10108
ABC	FEM	86	B	6647	10360

ANEXO E

Procedimento de imunotipagem dos monócitos

I. Avaliação do fenótipo HLA-DR

O fenótipo de monócitos foi avaliado através de um "*Kit"* (Becton-Dickinson - QuantiBRITE Anti-HLA-DR PE / Anti-monocyte PerCP-Cy 5.5) que reconhece o antígeno de histocompatibilidade maior classe II , sem reação cruzada com as moléculas HLA-DQ e HLA-DP. O reagente "*anti-monocyte PerCP-Cy 5.5*" reconhece monócitos mediante duas marcações: através do antígeno CD14, identificando a maioria da população de monócitos, e pelo reconhecimento de CD64, que se expressa em monócitos e, em níveis baixos, em neutrófilos e em uma subpopulação de células dendríticas.

O protocolo para avaliação do fenótipo englobou as seguintes etapas: cada tubo de análise recebeu 50 µL de sangue total e 20 µl do reagente *QuantiBRITE Anti-HLA-DR PE/ Anti-Monocyte Per CP-Cy 5.5*, sendo, em seguida, incubado no escuro por 30 minutos. Posteriormente, foi feita a lise de hemácias com solução de lise. Após 20 minutos, foi procedida centrifugação a 1500 rpm em temperatura ambiente por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante e sendo o depósito ressuspenso em PBS. Após nova centrifugação, com a mesma rotação, retirou-se o sobrenadante e as células foram fixadas em paraformaldeído para leitura, que foi feita em citômetro de fluxo (*FACScalibur Becton Dickinson*) utilizando-se um método quantitativo para a leitura de anticorpos ligados por célula, segundo recomendações do fabricante. Para melhor identificação dos monócitos marcados com CD14 (PerCP-Cy), utilizou-se, no gráfico de regiões, o canal de fluorescência FL3, que é o canal onde se tem melhor marcação para o corante utilizado.

II. Expressão quantitativa de CD64

A expressão de CD64 foi avaliada em monócitos a partir de um *"Kit"* Becton- Dickinson (*QuantiBRITE CD 64/ CD45 PerCP*) que permite a identificação da glicoproteína FcγRI (CD64) – que, como visto acima, é o receptor tipo I para a fração Fc da IgG – e de todos os leucócitos presentes na amostra, através da detecção do CD45 (antígeno leucocitário comum). Avaliou-se a mediana da intensidade de fluorescência de CD64 (anticorpo monoclonal marcado com PE), com ajuste para a avaliação de sua expressão quantitativa.

Em cada tubo foi adicionado sangue total (50µl) e 20 µL do reagente "*QuantiBRITE CD 64/CD 45 PerCP".* Seguiu-se incubação no escuro por 30 minutos e lise de hemácias, com centrifugação, lavagem em PBS e re-suspensão do depósito de células em paraformaldeido 1% para leitura em citômetro de fluxo. A técnica empregada permitiu a definição das regiões específicas dos monócitos. Novamente, da mesma forma que se utilizou o reagente PerCP na

definição de regiões celulares, utilizou-se o canal FL3 de fluorescência para identificação das células marcadas.

III. Análise quantitativa de HLA-DR e CD64

Esta etapa permitiu uma estimativa quantitativa do número de anticorpos ligados a cada célula. A partir de quantificação fluorescente baseada no *Kit* "QuantiBRITE PE" (Becton Dickinson), que contém uma mistura de contas (*beads*) microscópicas marcadas em sua superfície com ficoeritrina (PE) em quatro níveis diferentes de densidade, é possível, com os mesmos parâmetros de compensação e fluorescência do ensaio dos anticorpos monoclonais, converter o eixo de FL2 no número de moléculas PE ligadas por célula.

Utilizando-se relações fluorcromo-proteína conhecidas de PE para anticorpos (fornecidas pelo fabricante do *Kit*), é possível converter moléculas de PE por célula para anticorpos por célula, utilizando o programa *CELLQues*t, após calibração com as contas *CaliBRITE*. A Figura 1A ilustra os gráficos produzidos pelo *software CELLQuest*, revelando a detecção média de eventos (em escala logarítmica – $\log_{10}$) à citometria de fluxo – que permite o cálculo da expressão de moléculas HLA-DR e CD64 nas células estudadas – da amostra referente a um dos indivíduos idosos relativamente saudáveis estudados.

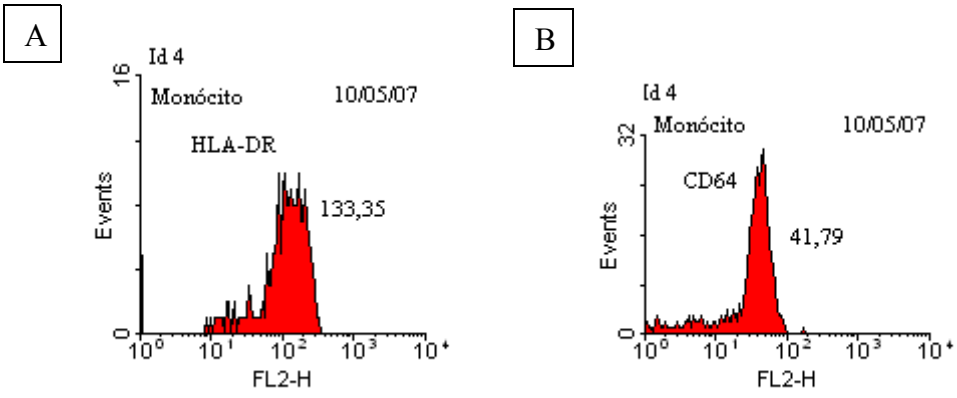


FIGURA 1. Gráficos produzidos pelo *software CELLQuest* à citometria de fluxo do controle idoso número 4 – em A, detecção de eventos relativos à expressão de moléculas HLA-DR em monócitos; em B, detecção de eventos relativos às moléculas CD64 em monócitos.

Esta última etapa foi realizada na Unidade de Citometria de Fluxo do Laboratório de Imunopatologia (LIP) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (FCM/UERJ). Para tanto, foi utilizado o citômetro de fluxo *FACScalibur* (Becton Dickinson), utilizando-se um método quantitativo para a leitura de anticorpos ligados por célula, segundo recomendações do fabricante.

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