



Sara Louro Moleirinho

Licenciada em Biologia

**Avaliação da Explosão Oxidativa em
Neutrófilos de Doentes com Sepsis – Uma
Abordagem Longitudinal**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Patrícia Napoleão

Co-orientador: Paula Gonçalves, Professora Auxiliar na
Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

2013



Sara Louro Moleirinho

Licenciada em Biologia

**Avaliação da Explosão Oxidativa em
Neutrófilos de Doentes com Sepsis – Uma
Abordagem Longitudinal**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Patrícia Napoleão

Co-orientador: Paula Gonçalves, Professora Auxiliar na
Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

2013

Copyright Sara Louro Moleirinho, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à Patrícia Napoleão, minha orientadora, por toda a disponibilidade e ajuda que me deu no desenvolver deste trabalho, quando nem sempre foi fácil para ela, mas nunca deixando de estar presente. Agradeço também por me ter dado a independência necessária para cometer erros e resolvê-los por mim própria, sendo que acredito que só assim se formam bons profissionais.

Agradeço também à Prof.^a Doutora Carlota Saldanha por me ter aceite na sua unidade, de me ter dado a oportunidade de poder desenvolver este projecto e de poder trabalhar com a sua equipa.

A essa equipa, Ana Silva e Ângelo Calado, também o meu obrigado.

Agradeço às equipas médicas que conosco trabalharam, nomeadamente ao Dr. António Messias, Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Beatriz Ângelo que se disponibilizou a ceder-nos os doentes diagnosticados com sepsis. Ao Prof. Doutor Miguel Mota Carmo, que permitiu a inclusão dos doentes com artrite reumatóide neste estudo. E por último, às equipas do Instituto Português do Sangue, onde recolhemos os controlos saudáveis para o presente trabalho.

Agradeço também à Teresa Freitas, técnica de laboratório, pela total disponibilidade para me ajudar em tudo quanto foi necessário, assim como pela companhia no pequeno laboratório. Pela companhia também, principalmente naqueles sábados vazios, e pela ajuda agradeço à minha colega Ekatrina, que sempre que necessário se disponibilizou a ir buscar as minhas amostras.

Dedico este trabalho ao meu pai, que me deu a oportunidade de estudar e que sacrificou muito dele por mim, e que participou activamente neste projecto, levando-me sempre que necessário recolher uma amostra. Agradeço-lhe principalmente por aturar os meus maus humores sempre que demasiado cansada e por me ter dado a força necessária para seguir em frente.

À minha mãe e às minhas irmãs, muito obrigada pelo total apoio e também por entenderem quando não pude estar presente.

À minha tia Sandra, acho que um muito obrigada chega.

À Andreia e à Ana, que sendo o meu braço direito e esquerdo, me ajudaram quer no desenvolver do trabalho quer a título pessoal e se mantiveram ao meu lado sempre e incondicionalmente. Ao Paulo, que não sendo do meu sangue considero meu irmão, obrigada por me tirares de casa e me levares a desanuviar e pelo apoio hoje e sempre.

Às minhas amigas que partilharam comigo o momento de desenvolver e escrever uma tese, Juliana, Graça, Clara e Andreia agradeço por toda a ajuda e por todo o apoio mútuo.

Por último, agradeço ao João, em quem descarreguei grande parte das minhas frustrações quando o trabalho não corria bem e que mesmo assim se manteve ao meu lado.

Sinto que estas palavras são poucas para expressar realmente a minha gratidão por todas as pessoas que comigo trabalharam e/ou me apoiaram nesta fase que agora termina, portanto saibam que, a todos, agradeço profundamente.

Abstract

Sepsis is a complex disease and, until today, the main cause of death in ICU all over the world.

The proposal of this investigation was to define the prognostic of the disease based on the study of levels of ROS production by the neutrophils, named oxidative burst, by comparing the acute inflammatory situation, using sepsis patients, not only with healthy controls but also with a chronic inflammation situation, by the inclusion of RA patients.

The production of ROS by the neutrophils was studied using DHR 123, by doing three assays: basal levels, and neutrophil stimulation with fMLP and PMA.

The results obtained in the present work may suggest that, in sepsis cases there is, effectively, an abnormal ROS production and, also, that the prognostic is more favorable as the difference, in the ROS levels, between the admission in the ICU and the 24 hour of admission is lower. In that cases, is expected a decrease, in ROS levels, in that same period of time.

Keywords: Inflammation, Neutrophils, Oxidative burst, Sepsis, Rheumatoid arthritis

Resumo

Uma vez sendo uma doença complexa, a sepsis é ainda a principal doença responsável pelo maior número de mortes em Unidades de Cuidados Intensivos por todo o mundo.

A proposta deste trabalho consistia em definir o prognóstico da doença com base no estudo dos níveis de produção de ROS pelos neutrófilos, denominado explosão oxidativa, comparando uma situação de inflamação aguda, através de doentes com sepsis, não só com indivíduos saudáveis mas também com situações de inflamação crónica, incluindo no estudo doentes com AR.

A produção de ROS pelos neutrófilos foi estudada utilizando-se DHR 123 através da realização de três ensaios: níveis basais, e com estimulação fMLP e com PMA, e analisando as amostras por citometria de fluxo.

Os resultados obtidos na presente tese parecem sugerir que, em casos de sepsis há efectivamente uma produção de ROS acima do normal e, também, que o prognóstico é tanto mais favorável quanto menor for a diferença, nos níveis de ROS, entre a admissão à UCI e as 24 horas de internamento. Nesses casos, espera-se uma diminuição nos níveis de produção de ROS nesse mesmo período.

Palavras-Chave: Inflamação, Neutrófilos, Explosão oxidativa, Sepsis, Artrite reumatóide

Tabela de Conteúdos

Agradecimentos	vii
Abstract	ix
Resumo	xi
Índice de Figuras.....	xv
Índice de Tabelas.....	xvii
Abreviaturas	xix
1. Introdução	1
1.1. Inflamação.....	1
1.1.1. Resposta inflamatória aguda vs. Resposta inflamatória crónica.....	5
1.2. Doenças inflamatórias.....	5
1.2.1. Sepsis.....	6
1.2.2. Artrite reumatóide.....	8
1.3. Objectivo.....	10
2. Materiais e Métodos.....	11
2.1. Grupos de estudo.....	12
2.1.1. Caracterização dos grupos de estudo - critérios de inclusão e exclusão.....	12
2.1.2. Protocolo de recolha e amostragem.....	13
2.2. Explosão oxidativo em neutrófilos.....	13
2.2.1. Procedimento experimental.....	13
2.2.2. Citometria de fluxo.....	14
2.2.3. Análise de dados.....	14
2.3. Análise Estatística.....	14
3. Resultados.....	15
3.1. Caracterização dos grupos de estudo.....	15
3.2. Comparação da explosão oxidativa em neutrófilos entre grupos.....	17
3.3. Comparação entre grupos após estimulação com fMLP e PMA.....	17
3.4. Estudo longitudinal.....	19
3.4.1. Condição basal.....	19
3.4.2. Estimulação com fMLP e PMA.....	20
3.5. Análise de prognóstico.....	21
4. Discussão.....	25
5. Conclusão.....	31
5.1. Limitações de estudo.....	31
5.2. Perspectivas futuras e implicações.....	31
6. Referências.....	33

Anexo I.....	37
1. Citometria.....	37
2. Settings.....	40
Anexo II.....	41
1. Classificação clínica das classes de sepsis.....	41
Anexo III.....	43
1. Tabelas referentes aos dados gráficos.....	43

Índice de Figuras

Figura 1.1- Sinais clássicos de inflamação: calor, rubor, edema e dor; eventualmente perda de função (adaptado de Lawrence <i>et al.</i> , 2002)	1
Figura 1.2- Processo inflamatório: agressão externa, inoculação de microrganismos patogénicos, chamada de células ao local. Vasodilatação e extravasamento de leucócitos. Eliminação do microrganismo agressor	2
Figura 1.3- Processo de migração dos neutrófilos e as moléculas associadas: primeiro os neutrófilos rolam sobre o endotélio, ficando activados, seguindo a adesão ao mesmo através de moléculas de adesão. Deslizam pelo endotélio seguindo-se a sua transmigração, paracelular ou transcelular, através do endotélio. (adaptado de Ley <i>et al.</i> , 2007)	3
Figura 1.4- Cascata do Sistema do Complemento: existem três vias de activação do complemento, a via clássica, a via das lectinas e a via alternativa. Apesar de terem diferentes componentes, todas culminam na activação de C3, e conseqüente activação de C5 e formação do complexo de ataque à membrana (MAC) (adaptado de Cook e Botto, 2006)	4
Figura 1.5- Artrite Reumatóide: representação de inflamação resultante de artrite reumatóide na articulação do joelho	8
Figura 3.1- Percentagem de neutrófilos produtores de ROS em condição basal	17
Figura 3.2- Percentagem de neutrófilos produtores de ROS após activação com fMLP	18
Figura 3.3- Percentagem de neutrófilos positivos para rodamina após estimulação com PMA	18
Figura 3.4- Percentagem de neutrófilos activados em condição basal, e com os estimuladores fMLP e PMA para cada grupo de estudo	19
Figura 3.5- Percentagem de neutrófilos activados em condição basal em doentes com sepsis ao longo do tempo de internamento na UCI	20
Figura 3.6- Percentagem média de activação de neutrófilos após estimulação com fMLP (estudo longitudinal)	20
Figura 3.7- Percentagem média de activação de neutrófilos após estimulação com PMA (estudo longitudinal)	21
Figura 3.8- Comparação de valores médios de produção de ROS basais entre Sobreviventes e Não-sobreviventes	22
Figura 3.9- Comparação dos níveis médios de produção de ROS após estimulação com fMLP entre Sobreviventes e Não-Sobreviventes	22
Figura 3.10- Comparação dos níveis médios de produção de ROS após estimulação com PMA entre Sobreviventes e Não-Sobreviventes	23
Figura I.1- Dot plot de uma amostra de sangue total	38
Figura I.2- Sobreposição de espectros entre 2 fluoróforos (R-PE e Alexa Fluor 488)	39
Figura I.3- Esquema de uma citómetro de fluxo	40

Índice de Tabelas

Tabela 2.1- Esquema de diluição das diferentes soluções	11
Tabela 3.1- Dados demográficos, fisiológicos e clínicos dos indivíduos incluídos neste estudo ...	17
Tabela 3.2- Dados referentes ao tempo médio de internamento na UCI, ao número de altas do Hospital ou UCI e ao número de mortes no Hospital ou UCI, no que diz respeito aos doentes de sepsis	17
Tabela 3.3- Dados clínicos dos doentes de sepsis e valores de referência para indivíduos saudáveis na média de idades do presente estudo, e comparação entre os vários momentos do estudo	18
Tabela III.1 - Percentagem de neutrófilos produtores de ROS correspondentes ao ensaio Basal para os três grupos de estudo	43
Tabela III.2- Percentagem de neutrófilos produtores de ROS correspondentes ao ensaio com estimulação de fMLP para os três grupos de estudo	43
Tabela III.3 - Percentagem de neutrófilos produtores de ROS correspondentes ao ensaio com estimulação de PMA para os três grupos de estudo	43
Tabela III.4- Variação da percentagem de neutrófilos produtores de ROS ao longo do tempo em doentes com sepsis para as subclasses Sobreviventes e Não sobreviventes correspondentes ao ensaio Basal	44

Tabela III.5 - Variação da percentagem de neutrófilos produtores de ROS ao longo do tempo em doentes com sepsis para as subclasses Sobreviventes e Não sobreviventes correspondentes ao ensaio com estimulação de fMPL.....44

Tabela III.6 - Variação da percentagem de neutrófilos produtores de ROS ao longo do tempo em doentes com sepsis para as subclasses Sobreviventes e Não sobreviventes correspondentes ao ensaio com estimulação de PMA.....44

Abreviaturas

AR – artrite reumatóide

DHR 123 – Dihidrorodamina 123

DAMPs – do inglês *damage- associated molecular patterns*

fMLP – do inglês *formyl-methionyl-leucyl-phenylalanina*

LPS – lipossacarídeo

PMA – do inglês *phorbol-myristate-acetate*

PAI-1 – do inglês *Plasminogen Activator Inhibitor-1*

PAF – do inglês *platelet activation factor*

ROS – do inglês *reactive oxygen species*

RF – do inglês *rheumatoid factors*

TNF- α – do inglês *tumor necrose factor- α*

TLR – do inglês *Toll like receptors*

UCI – unidade(s) de cuidados intensivos

1. Introdução

1.1. Inflamação

A resposta inflamatória é uma resposta biológica e fisiológica, dos tecidos vivos, a uma agressão. É caracterizada fundamentalmente por diversos fenómenos locais (que decorrem na zona da lesão) associados a alterações sistémicas cujo objectivo é localizar neutralizar e/ou eliminar o agente agressor (bacteriano, viral ou outro).

Aulus Cornelius Celsus (séc. I d.C.) definiu, há mais de 2000 anos atrás, os quatro sinais clássicos da resposta inflamatória: calor, rubor, tumor (edema) e dor. Em casos de persistência do processo inflamatório existe ainda a perda de função dos tecidos agredidos (Figura 1.1).

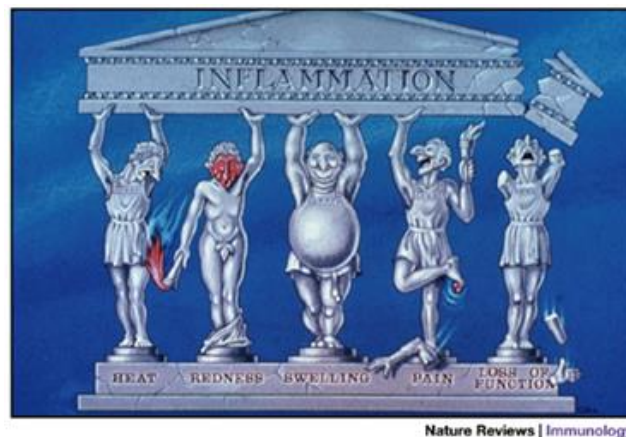


Figura 1.1- Sinais clássicos de inflamação: calor, rubor, edema e dor; eventualmente perda de função (adaptado de Lawrence *et al.*, 2002).

Os sinais acima referidos poderão ser explicados pelos seguintes mecanismos do processo inflamatório: após a agressão ocorrem alterações no calibre dos vasos, as quais dependem da intensidade do estímulo, quanto mais intenso for mais rapidamente se verifica vasoconstrição transitória (3 a 5 minutos) seguida de vasodilatação (rubor e calor). Dá-se então o aumento da permeabilidade vascular, devido à diminuição da pressão osmótica intravascular, há acumulação de água e proteínas no espaço extravascular e o fluxo circulatório diminui-estase (edema). A dor ocorre por estimulação local das fibras nervosas. (Pinto, 2009)

Assim, o tecido agredido induz, na microcirculação, uma vasodilatação que propicia o afluxo de sangue ao tecido e otimiza o transporte de mediadores celulares e moleculares (Figura 1.2.).

A inflamação é uma resposta inata, estereotipada e é independente da natureza do estímulo e da existência, ou não, de um contacto prévio com o mesmo. Os mediadores da inflamação constituem uma rede organizada de comunicação e de ampliação de respostas biológicas. Para a indução deste

fenómeno podem contribuir dois mecanismos de respostas imunitária: resposta inata, rápida mas inespecífica; e resposta adquirida, lenta e complexa, antígeno-específico.

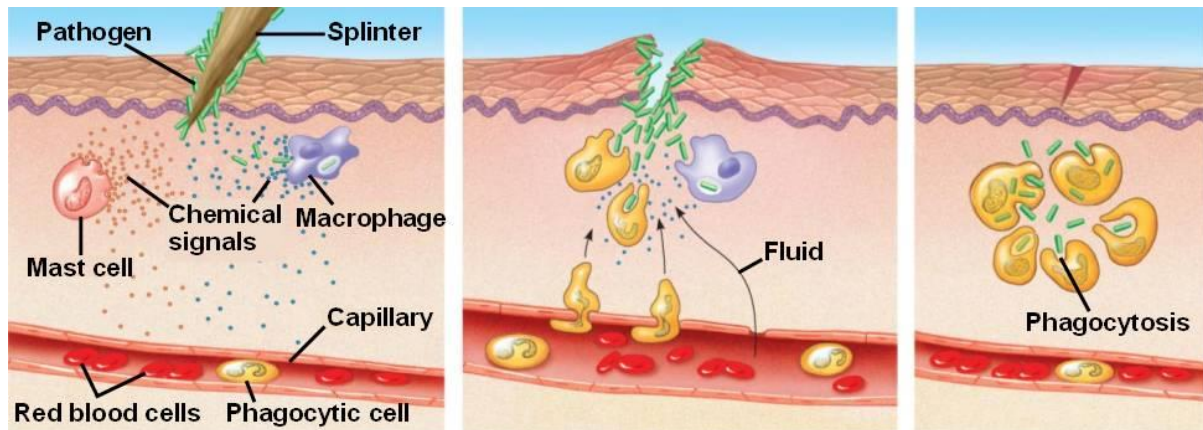


Figura 1.2- Processo inflamatório: agressão externa, inoculação de microrganismos patogénicos, chamada afluxo de leucócitos ao local. Vasodilatação e extravasamento de leucócitos. Eliminação do microrganismo agressor. (adaptado de www.bio1152.nicerweb.com – Local Inflammation)

Quando a resposta inata não é suficiente para atingir o objectivo (eliminar o agente agressor), a sua permanência permite o estabelecimento de uma resposta imunológica adaptativa (ou adquirida), ou seja, gerar anticorpos específicos para que as células portadoras de antígenos estranhos sejam reconhecidas e eliminadas (resposta humoral/resposta celular).

Do sistema imunitário fazem parte um conjunto de células denominadas leucócitos, que têm um papel central no processo inflamatório. Têm como função proteger o organismo contra infecções e dividem-se em dois grupos: granulócitos, que apresentam características físicas como núcleo de forma irregular e presença de grânulos específicos no citoplasma- neutrófilos, eosinófilos e basófilos; e agranulócitos, cuja forma é mais regular e não apresentam granulações específicas- linfócitos e monócitos. (Arosa *et al.*, 2007)

Os neutrófilos representam a primeira linha de defesa do organismo contra agentes patogénicos invasores e constituem aproximadamente 40-60% da população de glóbulos brancos. Quando activos podem fazer a maior parte, se não todas, das funções dos macrófagos. (Wright *et al.*, 2010)

Em condições fisiológicas encontram-se em circulação menos de 2% de neutrófilos, uma vez que estes passam grande parte da sua vida na medula óssea (Sadik *et al.*, 2011), sendo recrutados apenas quando existe uma produção de estímulos por parte do tecido danificado. A passagem dos neutrófilos, da medula óssea, para o sangue periférico é altamente regulada antagonisticamente pelos receptores de quimiocinas CXCR₁, CXCR₂ e CXCR₄ (ambos expressos em neutrófilos). O último retém os neutrófilos no interior da medula enquanto CXCR₂ facilita a sua passagem para o sangue periférico. (Sadik *et al.*, 2011)

Quando existe uma lesão, as células são recrutadas para o local da mesma por um processo designado quimiotaxia - chamada unidireccional de células, numa movimentação orientada por um gradiente químico. Deste processo fazem parte diferentes factores quimiotácticos, que podem ser exógenos (produtos bacterianos) ou endógenos (de natureza molecular) no qual se inserem factores

do sistema do complemento e quimiocinas (Arosa *et al.*, 2007) Estas podem actuar localmente para induzir o recrutamento de neutrófilos para os tecidos periféricos e à distância para induzir a mobilização a partir da medula óssea. (Sadik *et al.*, 2011)

Esta mobilização, seja dos tecidos periféricos ou da medula, resulta na migração dos leucócitos para os locais da agressão, sendo este um processo complexo e sequencial: marginação dos leucócitos seguida do rolar das células sobre o endotélio. Este movimento celular é caracterizado pela expressão, por parte das células endoteliais, da molécula de adesão P-selectina em resposta a histamina, trombina e factor de activação plaquetária (PAF), levando à activação das células. Segue-se a adesão celular, onde citocinas pró-inflamatórias – como a interleucina 1 beta (IL-1 β) e o factor tumoral de necrose alfa (TNF- α), medeiam a expressão de moléculas de adesão celular como a E-selectina, a molécula de adesão intercelular1 (ICAM-1), e a molécula de adesão celular vascular (VCAM-1). Após aderirem ao endotélio, os leucócitos transmigram através do tecido endotelial num processo denominado diapedese, o qual é um processo rápido em que os leucócitos se estendem através da emissão de pseudópodes entre duas células endoteliais. A transmigração celular pode ser paracelular ou transcelular (Figura 1.3) e é regulada por proteínas expressas na superfície de leucócitos e células endoteliais, como a molécula de adesão celular endotélio-plaqueta 1 (PECAM-1) e o CD99, as quais actuam em passos sequenciais à medida que as células atravessam a barreira endotelial.

Para manter a integridade vascular durante a transmigração são produzidas moléculas de adesão celular localizadas perto das junções de aderência e das junções apertadas, tais como vasculo-endotelial (VE)-caderina, caderina S, CD144, entre outras. (Pinto, 2009)

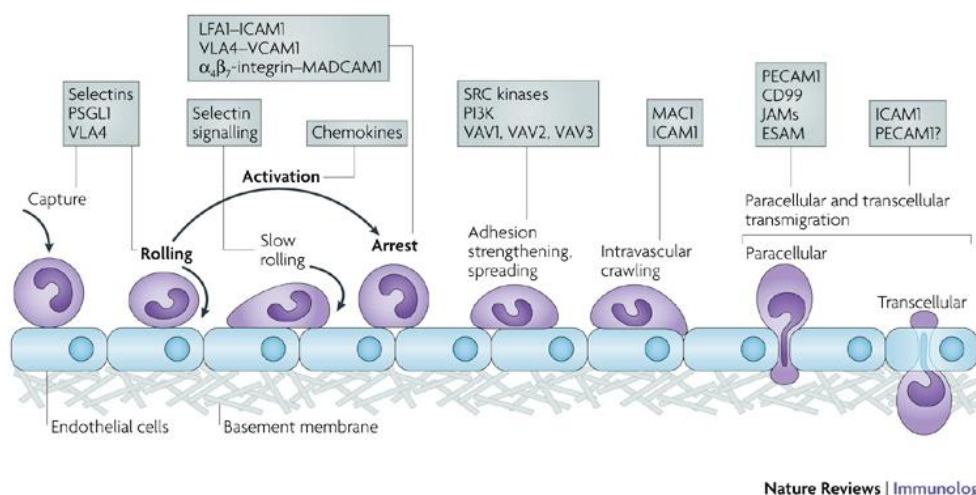


Figura1.3- Processo de migração dos neutrófilos e as moléculas associadas: primeiro os neutrófilos rolam sobre o endotélio, ficando ativados, seguindo-se a adesão ao mesmo através de moléculas de adesão. Os neutrófilos deslizam pelo endotélio seguindo-se a sua transmigração, paracelular ou transcelular, através do endotélio (adaptado de Ley *et al.*, 2007).

Parte importante da resposta inflamatória é um mecanismo da imunidade inata denominado Sistema do Complemento. Tem um carácter inespecífico no que diz respeito à resposta imunitária mas constitui um elo de ligação fundamental para o estabelecimento da imunidade adquirida.

O Sistema do Complemento é constituído por uma série complexa de proteínas plasmáticas e de membrana que levam a processos biológicos importantes no processo inflamatório como opsonização, quimiotaxia, imunoaderência, lise celular, entre outros.

As proteínas que fazem parte deste sistema são maioritariamente produzidas no fígado, mas também pelos macrófagos tecidulares e pelos fibroblastos, estas estão presentes no plasma na sua forma inactiva- zimogénios.

Existem três vias de activação do complemento (Figura 1.4):

- a via clássica- iniciada por um anticorpo complexado a um antígeno;
- a via da lectina- iniciada pela ligação do complexo MBL-MASP-2 a estruturas carboidratadas da parede de agentes bacterianos;
- e a via alternativa- iniciada por certos produtos e componentes bacterianos, alguns vírus e enzimas proteolíticas.

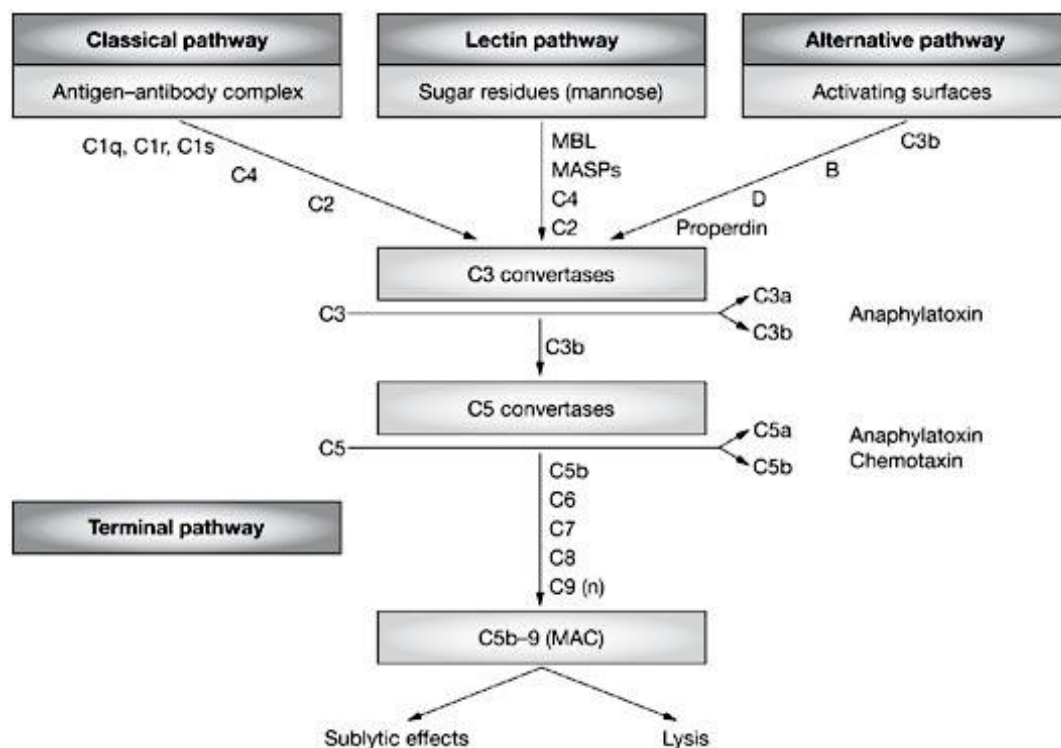


Figura 1.4- Cascata do Sistema do Complemento: existem três vias de activação do complemento, a via clássica, a via das lectinas e a via alternativa. Apesar de terem diferentes componentes, todas culminam na activação de C3, e conseqüente activação de C5 e formação do complexo de ataque à membrana (MAC) (adaptado de Cook e Botto, 2006).

Qualquer uma das três vias compreende três fases, a fase de iniciação particular para cada uma das vias, a fase de amplificação em que a activação de C3 é comum a todas as vias. Essa activação dá-se através da clivagem de C3 em C3a e C3b. A última fase é a fase de ataque à membrana (MAC), esta é a fase de activação comum às três vias, que termina na lise celular das células dos organismos invasores. (Arosa *et al.*, 2007)

1.1.1. *Resposta inflamatória aguda vs. Resposta inflamatória crónica*

Ao processo inicial de inflamação chama-se inflamação aguda, em que as primeiras células a migrar para o local da lesão são, habitualmente, os neutrófilos, aí permanecendo em maioria durante dias. Quase simultaneamente, começam a afluir linfócitos T citotóxicos e, mais tarde, linfócitos B. (Arosa *et al.*, 2007)

A evolução de uma reacção inflamatória aguda depende da circunstância dos antígenos presentes serem ou não eliminados. No caso de persistirem, a inflamação evolui para um estado crónico. Deixam de afluir mais neutrófilos (que diminuem em percentagem), e passam a acumular-se, no local da inflamação, linfócitos T auxiliares e fagócitos mononucleados.

Por outro lado, a resposta inflamatória pode ainda ser local, restrita à zona da agressão, ou sistémica, quando se alastra por via circulatória a outros locais do corpo.

De uma forma simplista podemos referir a resposta inflamatória aguda como breve e com resposta rápida à agressão (resposta terapêutica), e a resposta crónica como prolongada e menos exuberante na sua tradução clínica.

No entanto, em alguns casos, a resposta inflamatória crónica refere-se apenas a uma resposta imune que persiste apenas enquanto se mantiver o mecanismo de agressão (como é o caso do granuloma em casos de tuberculose, que se mantém apenas até que a doença seja tratada). Quando o processo crónico é patológico diz-se que é uma inflamação que persiste. De notar, que estes conceitos são artificiais e subjectivos, dependendo dos autores. A diferença entre os conceitos reside no facto de que, caso a inflamação persista após a eliminação da agressão, passa a ser autónoma, auto-entretida, independente de fenómenos externos ao hospedeiro e ditada pelas características de regulação biológica do indivíduo. (Pinto, 2009)

Para efeitos deste trabalho, considera-se a resposta inflamatória crónica como o processo patológico.

1.2. Doenças inflamatórias

Doenças inflamatórias resultam da perpetuação da resposta inflamatória num tempo acima daquele que é esperado para a resolução do problema que deu início a essa mesma resposta ou a uma incorrecta libertação de mediadores de inflamação aquando de um episódio agudo da mesma resposta.

São exemplos de doenças inflamatórias, o vulgar acne inflamatório, que resulta da resposta do hospedeiro a *P.acnes*, um comensal que faz parte da flora normal da pele e cujo crescimento e metabolismo nos folículos onde tem o seu nicho, resulta na produção de quimioattractantes de neutrófilos, activação do complemento e como consequência gera um processo inflamatório. (Webster, 2002) Outro exemplo é a asma, que causa inflamação exacerbada nas vias respiratórias, devido a por uma hipersensibilidade a alérgenos (pêlos de animais, pólenes ou ácaros, entre outros) num processo alérgico exacerbado. Qualquer outro processo alérgico como a rinite ou o eczema são também consideradas doenças inflamatórias. (A.D.A.M. Illustrated Medical Encyclopedia- PubMed Health)

Existem ainda doenças auto-imunes em que sistema imunitário ataca indevidamente tecido saudável, como é o caso do lupus eritematoso, e que têm uma componente considerável de doença

inflamatória crónica. No caso do lupus eritematoso, pode afectar pele, articulações, cérebro e outros órgãos e tem, tal como na maioria das doenças auto-imunes, etiologia desconhecida.

As doenças acima referidas são exemplos de doenças inflamatórias que apresentam episódios agudos e crónicos (respectivamente). Na secção seguinte apresentam-se duas doenças que descrevem também episódios agudos e crónicos da doença inflamatória e que são o principal foco deste trabalho.

1.2.1. Sepsis

Dada a complexidade de sintomas da sepsis, esta foi definida como síndrome de resposta inflamatória sistémica (SIRS) devido a infecção presumida ou confirmada. (Brien et al. 2007)

É uma doença inflamatória sistémica aguda.

De acordo com determinados parâmetros clínicos, a sepsis pode ser definida em três classes diferentes, sepsis simples, sepsis severa e choque séptico, de acordo com a gravidade do quadro clínico apresentado.

Em termos epidemiológicos, a doença ocorre em 2% de todas as hospitalizações em países desenvolvidos, e pode ocorrer entre 6 a 30% de todos os pacientes em Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs), ocorrendo em maior proporção em doentes com patologia interna (pneumonia, peritonite, etc.) ou que tenham sofrido traumatismos severos. (Martin, 2013)

Existem alguns factores de risco que podem contribuir para o desenvolvimento da doença, sendo que a idade é reconhecida como um factor fulcral. Algumas co-morbilidades também podem ser apontadas, tais como HIV, cancro e diabetes, uma vez que alteram o sistema imunitário. O facto de haver um comprometimento do sistema imunitário torna indivíduos com tais patologias mais susceptíveis a desenvolver sepsis e também de desenvolverem infecções nosocomiais que podem levar à doença, para isso contribui o facto de estarem em constante contacto com sistemas de saúde. (Martin, 2013)

Evidências recentes mostram que a genética pode também ter um papel importante no desenvolvimento e desfecho de sepsis, Wingeyer *et al.* (2012) descreveram um polimorfismo, PAI-1 rs1799889 4G, cuja presença prevê um desfecho desfavorável da doença à data da admissão na UCI. O mesmo estudo descreveu, em casos de sepsis, o sistema respiratório como sendo o local mais frequente de infecção, seguido do Sistema Nervoso Central, da pele e outros tecidos moles e na mesma percentagem, outros locais do corpo. No entanto, evidências mais recentes comprovam o sistema respiratório como o principal local de infecção, nomeadamente devido a pneumonias, seguido de infecções intra-abdominais (peritonites) e tracto urinário. (Angus e Poll T., 2013). Os agentes patogénicos mais frequentemente isolados são bacterianos e em 26,1% dos pacientes não é isolado nenhum microorganismo.

De uma forma simplista, a sepsis pode ser descrita como um estado inflamatório sistémico (por todo o corpo), mas é preciso entender os mecanismos que levam a essa condição.

Durante a doença, o sistema imunitário inato é perturbado, uma vez que existe uma activação desregulada do Sistema do Complemento, que resulta na geração excessiva de dois dos seus

componentes que se comportam como anafilotóxicas, C3a e C5a, o que leva a uma disfunção nos neutrófilos. (Huber-Lang *et al.*, 2002)

Ehrnthal *et al.* (2012) estudaram o Sistema do Complemento em vários modelos de sepsis, descrevendo que este parece estar “excessivamente estimulado conduzindo à geração massiva de mediadores inflamatórios e a SIRS”.

Uma das principais formas dos neutrófilos eliminarem agentes patogénicos é a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS, como exemplo, superóxido O_2^- , peróxido de hidrogénio H_2O_2 e radical hidroxilo) dependente da enzima NADPH-oxidase. Esta é activada pela acção de mieloperoxidases. (Wright *et al.*, 2010)

No entanto, apesar de ser necessária a acção dos neutrófilos aquando de uma agressão ao organismo, a acção de neutrófilos indevidamente activados ou sobre activados acaba por causar danos nos tecidos, mesmo aqueles que não fazem parte do local de infecção, e isso é o que parece acontecer em casos de sepsis. Huber-Lang *et al.* (2002) usaram um modelo experimental (*cecal ligation/puncture* - CLP) em ratos para reproduzir o processo da doença e estudar os defeitos da imunidade inata, chegando à conclusão que a fagocitose e a habilidade para exercer uma explosão oxidativa correcta estão fortemente comprometidos. Com este modelo, verificou-se também a existência de defeitos na resposta das células à quimiotaxia, sendo que todas as disfunções são C5a-dependentes.

Além destes aspectos, foi ainda descrito em 2008, a existência de um atraso na apoptose dos neutrófilos que pode levar ao aumento do dano causado pela sua actividade pró-inflamatória, uma vez que a morte celular programada é essencial para a resolução da resposta inflamatória. Ao contrário do que se pensava, foi demonstrado que os neutrófilos possuem uma rede complexa de mitocôndrias, cuja função está envolvida na quimiotaxia e na regulação da apoptose, esta última através da manutenção do potencial de membrana. (Wright *et al.*, 2010) Em casos de sepsis é frequentemente observado dano mitocondrial, o que explicaria o atraso na apoptose, e a inibição desse dano reduz a gravidade da patologia em modelos da doença. (Phillipson & Kubersky 2011)

Em estadios mais avançados da doença observa-se, por outro lado, uma imunossupressão provocada por uma paralisia imunológica completa, por parte dos neutrófilos, onde importantes vias de sinalização intracelulares são completamente “bloqueadas”, levando a que os indivíduos fiquem susceptíveis a novas infecções sem que a inicial tenha sido resolvida.

Em casos mais graves da doença, existe muitas vezes disfunção de órgãos, sendo essa a principal causa de morte. Nesses casos, não só estão envolvidos neutrófilos como são parte essencial as plaquetas. Estas células anucleadas expressam muitos dos mais importantes receptores imunitários inatos, incluindo receptores tipo-Toll (TLRs), receptores para a protease activada de ligação à trombina, receptores do complemento e numerosas moléculas de adesão. Estudos em modelos animais indicam que as plaquetas são cruciais em casos de sepsis, sendo que, após administração de lipossacarídeos (LPS), que mimetizam a infecção por agentes bacterianos, várias células são sequestradas nos pulmões e ligam-se avidamente a neutrófilos aderentes no fígado. Esta ligação é atribuída a expressão de TLR4 expresso pelas plaquetas, sendo dependente deste receptor, levando a crer que as plaquetas participam activamente na interacção adesiva. Evidências

mostram até que apenas neutrófilos activados não causam danos no endotélio, mas a ligação plaquetas activadas por TLR4 – neutrófilos induz a morte de células endoteliais. (Phillipson & Kubes, 2011)

Esta disfunção plaquetária parece estar ligada a uma desregulação no sistema de coagulação em casos de sepsis, em que o dano causado implica uma hipoxia generalizada nos órgãos afectados, perda de células e por fim perda de função.

Assim sendo, e após o que foi descrito acima, podemos dizer que a sepsis é uma doença que depende de uma variedade de factores do organismo, ainda não entendidos na sua totalidade, que se relacionam entre si e que se relacionam com factores do próprio individuo (genética, idade, etc.) e cujo desenvolvimento e desfecho ainda não podem ser totalmente previstos. É, portanto, importante estudar mais profundamente estas relações de modo a agir o mais individualmente e precocemente aquando do desenvolvimento da doença, de modo a alcançar um resultado clínico o mais próximo possível de 0% de mortalidade.

1.2.2. Artrite Reumatóide

As doenças reumáticas são disfunções funcionais musculo-esqueléticas que não resultam de nenhum tipo de causas traumáticas, sendo que a sua causa não é ainda conhecida.

Estas doenças causam mais dor e incapacidade do que qualquer outro grupo de doenças, resultando em restrição de actividade e limitação social para aqueles que dela padecem. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam uma prevalência da doença entre 0,3 e 1% por todo o mundo, sendo mais comum em mulheres e em países desenvolvidos. A OMS indica também que 10 anos após o início da doença, pelo menos 50% dos doentes são incapazes de manter um trabalho a tempo inteiro. (WHO, 2007)

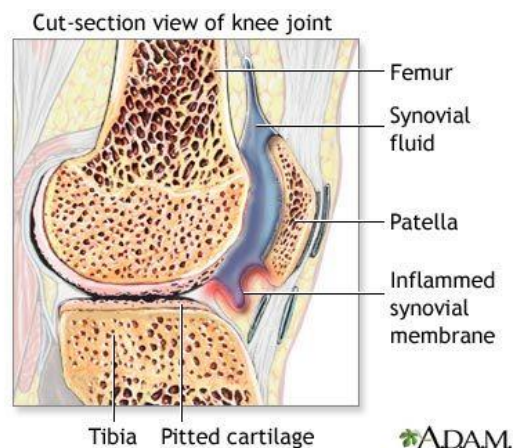


Figura1.5- Artrite Reumatóide: representação de inflamação resultante de artrite reumatóide na articulação do joelho. (A.D.A.M. Illustrated Medical Encyclopedia- PubMed Health)

A artrite reumatóide é uma doença inflamatória sistémica e crónica que se caracteriza pela hiperplasia dos fibroblastos sinoviais e vários níveis de erosão de osso e cartilagem (Figura 1.5). Leva à inflamação das articulações e dos tecidos circundantes, podendo afectar outros órgãos.

Tem um início lento, com uma dor suave nas articulações, rigidez e fadiga. Em estados mais avançados as articulações podem ficar deformadas. (A.D.A.M Medical Illustrated Encyclopedia, 2013)

A AR pode manifestar-se pela primeira vez em qualquer idade, mas existe um pico entre os 30 e os 50 anos, sendo que à medida que se avança na idade o risco torna-se maior.

Apesar da etiologia da doença não ser totalmente conhecida, evidências crescentes apontam para um pré-disponibilidade genética herdada, após exposição a factores externos. (Karlson & Deane, 2013)

A susceptibilidade genética é evidente em estudos de grupos familiares e em gémeos monozigóticos, tendo um risco de 50% para desenvolver AR. Fumar é o principal factor ambiental que pode levar ao despoletar da doença, em especial nos casos de predisposição genética. (Wasserman, 2011)

Em termos de processos fisiológicos, a artrite é caracterizada pela activação de vias de inflamação que levam à proliferação de células sinoviais nas articulações, esse processo leva à formação de pannus, “uma membrana de novo tecido conjuntivo (tecido granuloso) composto por células mesenquimais e derivadas da medula óssea”, a formação deste tecido leva a destruição da cartilagem e a erosão ósseas pela estimulação da libertação de factores como a citocina IL-1, factor de crescimento derivado das plaquetas, prostaglandinas e substância P pelos macrófagos.

Outro dos mecanismos envolvidos na patologia da AR é a acção dos neutrófilos. Mourão A. *et al.* (2010), descreveram num Case Report, que o tecido sinovial recolhido por biópsia nos primeiros momentos da doença se encontrava altamente infiltrado com neutrófilos, atribuindo um papel essencial a estas células nos momentos iniciais da AR. Apesar de ser atribuída, classicamente, a linfócitos T, estudos mostram que os neutrófilos são as células mais abundantes no fluído sinovial de doentes com AR activa.

Estudos sobre o papel dos neutrófilos na artrite reumatóide afirmam que, quando estes migram para as articulações afectadas encontram agregados de imunoglobulinas, estes complexos activam então receptores FC γ que se encontram na superfície das células, accionando a sua desgranulação e a produção de ROS. Isto acontece tanto no fluído sinovial como directamente na superfície da articulação. A este processo dá-se o nome de “fagocitose frustrada”, e pode ser um dos mecanismos de dano na articulação em casos de AR. Por outro lado, os “neutrófilos que migram para as articulações atingidas evidenciam alterações a nível molecular, as quais estão associadas a um atraso na apoptose; devido a este facto têm maior capacidade para provocar danos no tecido já que o seu tempo de vida é mais prolongado”. (Wright *et al.*, 2010)

Já em 2007, Weinmann e os seus colaboradores descreveram uma perturbação na apoptose dos neutrófilos em estadios precoces de artrite, o que pode levar à perpetuação dos danos agudos causados pela acção destas células até que se instale um processo crónico da doença.

A principal acção danosa por parte dos neutrófilos parece ser a produção de espécies reactivas de oxigénio, como descrito acima, devendo-se principalmente a uma activação inapropriada das células, cujo stress oxidativo resultante da libertação inapropriada de ROS está implicado na patologia da AR. (Wright *et al.*, 2010)

Em resumo, a artrite reumatóide é uma doença multifactorial, e cuja carga genética é o principal factor para se desenvolver quando influenciada por factores ambientais de risco, é uma doença extremamente debilitante mas cuja medicação adequada permite uma vida quotidiana com mais qualidade.

1.3. Objectivo

A sepsis é ainda hoje uma das principais causas de morte em unidades hospitalares por todo o mundo, particularmente em Unidades de Cuidados Intensivos onde 1/3 dos doentes diagnosticados com esta patologia morre. Assim, é importante perceber onde e como se pode actuar o mais precocemente para evitar um desfecho fatal.

O presente trabalho tem como objectivo estudar os níveis de produção de espécies reactivas de oxigénio por parte dos neutrófilos em sepsis ao longo do tempo. Pretende-se contribuir para o conhecimento da função dos neutrófilos na progressão da doença. Para além disso, numa perspectiva de aplicação clínica pretende-se estabelecer não só o ponto de intervenção médica o mais cedo possível com o intuito de prevenir um desfecho pouco favorável, como também perceber as diferenças de prognóstico entre doentes sobreviventes e não-sobreviventes.

2. Materiais e Métodos

O ensaio de estudo da função de neutrófilos centra-se na avaliação da produção de espécies reactivas de oxigénio por essas mesmas células, seja em cenário de doença inflamatória, nomeadamente em casos de sepsis, seja após estimulação externa.

Para o ensaio de estudo da função dos neutrófilos após estimulação externa utilizaram-se dois activadores de neutrófilos, *phorbol-myristate-acetate* (PMA, SIGMA®), e *N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine* (fMLP). Foram utilizados dois estimuladores dadas as suas propriedades distintas de activação das células, de modo a fazer uma avaliação melhorada quando comparados com condições basais, ou seja, sem estimulação.

Uma vez que a leitura de produção de espécies reactivas de oxigénio pelos neutrófilos é feita por citometria de fluxo, é necessário marcar tanto as células em estudo como atestar a produção desses compostos, assim utilizou-se anti-corpo contra neutrófilos humanos Anticorpo PerCP anti-human CD16 (BioLegend®) para marcar a população alvo, e dihidro-rodamina123 (DHR123, BD Bioscience®) para atestar a formação de espécies reactivas de oxigénio, ou seja, a explosão oxidativa pelos neutrófilos (ver Anexo I).

As soluções- mãe de PMA, fMLP e DHR123 foram previamente preparadas nas seguintes concentrações:

- PMA: 1,62mM ($1,62 \times 10^{-3}$ M)
- fMLP: 10^{-2} M
- DHR123: 10^{-2} M

Para a realização do trabalho, as “soluções-mãe” foram diluídas (“soluções-filha”) numa proporção de 1:100, segundo o esquema apresentado na tabela 2.1.

Tabela 2.1- Esquema de diluição das diferentes soluções

Solução- Filha	PMA	fMLP	DHR123	HBSS
PMA	10µl	-	-	990µl
fMLP	-	10µl	-	990µl
DHR123	-	-	10µl	990µl

2.1. Grupos de estudo

Esta tese de mestrado está incluída em dois projectos de investigação clínica em curso na UBiMI, designados “Evaluation of inflammation profiles in septic patients- contribution to multiple cross prognostic biomarkers” (Hospital Beatriz Ângelo/2013) e “Evaluation of inflammatory and adaptative immunity imbalance to improve prognosis of rheumatoid arthritis” (Liga Amigos do Hospital de Santa Marta/2012). Deste modo, os grupos de estudo do presente trabalho foram constituídos no âmbito destes projectos, tendo as colheitas ocorrido entre Janeiro e Junho de 2013.

Foram recrutados no total 49 indivíduos (19 mulheres e 30 homens) na Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Beatriz Ângelo, Loures, Serviço de Cardiologia do Hospital de Santa Marta, Lisboa, e ainda no Instituto Português do Sangue. Entre estes, incluem-se 14 doentes com sepsis e 15 doentes com artrite reumatóide, sendo os restantes indivíduos saudáveis.

Todos os participantes foram informados dos objectivos do estudo e assinaram um consentimento informado, submetido e aprovado pelas Comissões de Ética dos respectivos hospitais.

2.1.1. Caracterização dos grupos de estudo – critérios de inclusão e exclusão

a – Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo, doentes com diagnóstico de sepsis na admissão no Unidade de Cuidados Intensivos (UCI) do Hospital Beatriz Ângelo. Foram incluídos doentes nas três classes de sepsis, nomeadamente doentes com, síndrome de resposta inflamatória sistémica (SIRS) devido a infecção ou suspeita da mesma, com sepsis severa, e doentes em choque séptico.

Os critérios de diagnóstico para cada classe de sepsis foram definidos pela equipa médica no âmbito do projecto acima referido e estão discriminados em anexo (Anexo II), seguindo o protocolo apresentado para este projecto de dissertação.

Foram também recrutados doentes com artrite reumatóide na consulta de Avaliação de Risco Cardiovascular do Serviço de Cardiologia do Hospital de Santa Marta, com o objectivo de comparar os parâmetros em estudo numa situação de inflamação aguda (doentes com sepsis), com os valores obtidos em situação de inflamação crónica. Os doentes foram seleccionados previamente por não terem antecedentes de cardiopatia, nomeadamente de etiologia isquémica e sem patologia pulmonar.

Um grupo de controlo (CTR) constituído por voluntários saudáveis sem historial de doenças conhecidas foi seleccionado de entre os dadores de sangue do Instituto Português do Sangue, ao abrigo de um acordo celebrado entre esta instituição e o Instituto de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. Este grupo foi constituído com o intuito de estabelecer os valores de referência para os parâmetros estudados.

b – Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo indivíduos com idade abaixo dos 18 e acima dos 85 anos. Foram ainda excluídas mulheres grávidas, doentes com infecções por HIV ou com diagnóstico de hepatite B, e ainda doentes com diabetes *mellitus* ou insuficiência renal crónica.

2.1.2. *Protocolo de recolha e amostragem*

De modo a atingir o objectivo proposto, nos doentes com sepsis foi realizado um estudo longitudinal, com monitorização dos doentes nas primeiras 6 horas de admissão na UCI, 24 e 72 horas depois e à data da alta da UCI.

Posteriormente os doentes foram subdivididos em dois grupos de acordo com morte subsequente em sobreviventes e não sobreviventes.

Todos os doentes foram caracterizados para parâmetros clínicos e bioquímicos, tendo sido a caracterização complementada com dados demográficos (sexo e idade) e antropométricos (índice de massa corporal - IMC).

Para todos os indivíduos a recolha de sangue ocorreu por punção venosa, tendo sido utilizado como anticoagulante a heparina.

Todas as amostras foram processadas num período inferior a 3 horas após a recolha e analisadas no citómetro Fortessa BD Bioscience®LSR num período máximo de 4 horas após o seu processamento.

2.2. Explosão oxidativa em neutrófilos

2.2.1. *Procedimento experimental*

Este método permite estudar a produção de espécies reactivas de oxigénio por neutrófilos.

As soluções de estimuladores de activação foram diluídas, a partir de soluções-mãe, em concentrações finais de 10^{-4} M e $1,35 \times 10^{-5}$ M, para fMLP e PMA respectivamente. A solução de lise FACSLysing foi diluída a 1:10 a partir de uma solução-mãe a 10x.

Resumidamente, adicionou-se 100µl de sangue total heparinizado a cada microtubo, devidamente etiquetado, e a quantidade respectiva de fMLP, PMA e HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*).

Foram efectuados 4 ensaio com diferentes objectivos e propriedades. O ensaio "Autofluorescência" corresponde ao tubo de controlo de fluorescência negativa e permite estabelecer as regiões positivas para cada fluorescência em análise (ver Anexo I).

O ensaio "Basal" diz respeito ao ensaio em condições basais, ou seja, sem adição de estimuladores de neutrófilos. Enquanto, os ensaios "fMLP" e "PMA" permitem avaliar a função dos neutrófilos após estimulação com activadores externos.

Após breve agitação no vórtex, os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. Terminada esta incubação, foram adicionados 10µl de solução diluída DHR a todos os tubos, excepto ao tubo Autofluorescência ao qual se adicionou a mesma quantidade de HBSSi. Após nova incubação em banho-maria a 37°C durante 10 minutos, foi adicionado 1ml de solução de lise seguindo-se um período de incubação à temperatura ambiente de 20 minutos.

Procedeu-se, após essa incubação, a uma série de lavagens com centrifugações durante 5 minutos a 4000 g com desprezo dos sobrenadantes e ressuspensão dos precipitados em 1 ml de HBSSi. O processo de lavagem foi repetido num total de 3 vezes. Após a última lavagem, cuja quantidade de HBSS se alterou para a concentração de anti-corpo desejada, adicionou-se CD16-

PerCp (3µl de CD16- PerCp para 297µl de HBSS nos ensaios “Basal”, “fMLP” e “PMA”; e 300µl de HBSS no ensaio “Autofluorescência” sem adição de anti-corpo)

Após este procedimento, as amostras foram incubadas em gelo durante 30 minutos, no fim dos quais se adicionou a todos os microtubos 200 µl de HBSSi, transferindo-se de seguida todo o conteúdo para tubos de imunologia (aproximadamente 500 µl).

2.2.2. Citometria de fluxo

Após o processo laboratorial acima descrito, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo utilizando o citómetro Fortessa (BD Bioscience®LSR) na Unidade de Citometria de Fluxo do IMM.

Tanto quanto possível, todas as amostras processadas ao longo deste trabalho, foram adquiridas no citómetro seguindo o mesmo protocolo de voltagens e compensações (no que se designa por *settings*).

A informação em detalhe sobre a técnica de Citometria de Fluxo e os *settings* efectuados para este estudo encontra-se no Anexo I, que faz parte do presente trabalho.

2.2.3. Análise de dados

Os dados resultantes da citometria foram analisados no programa FlowJo, o qual permitiu calcular a percentagem média de neutrófilos positivos para rodamina (neutrófilos que estão a produzir ROS).

2.3. Análise Estatística

Os dados foram resumidos como desvio padrão (dp) para variáveis contínuas e como proporções para variáveis categóricas.

O objectivo do estudo pretendia comparar a explosão oxidativa de neutrófilos entre os três grupos de estudo, controlo, artrite reumatóide e sepsis. Para tal, foi realizada uma análise não-paramétrica com teste de Kruskal-Wallis.

Para além disso, no grupo de sepsis foi realizado um estudo longitudinal com quatro pontos de recolha de amostras. Como qualquer estudo longitudinal, os parâmetros medidos no mesmo indivíduo ao longo do tempo não são independentes, sendo necessários métodos estatísticos específicos. Assim, usou-se um algoritmo de regressão que incorpora as medidas repetidas realizadas. O método estatístico escolhido foi o modelo linear de efeitos mistos (*linear mixed effect model – LME*) (J.W.R. Twisk, *Applied longitudinal data analysis for epidemiology*, Cambridge: Cambridge University Press, Cambridge, 317 2004, p. 318). Este modelo estatístico permite descrever as variações longitudinais de cada doente de sepsis através do cálculo de declives e médias da variável em cada tempo de recolha. Assim, permite obter uma estimativa das diferenças nos declives médios entre a admissão ao hospital (0 horas) e os outros pontos de recolha (24 h, 72 h e alta da UCI), dando uma medida da variação da percentagem de neutrófilos DHR⁺ ao longo do tempo.

Os valores obtidos foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Na análise estatística recorreu-se aos softwares SPSS 20.0, R2.14.1 e ainda aos softwares de análise gráfica Excel 2010 e GraphPad Prism 5.

3. Resultados

3.1. Caracterização dos grupos de estudo

Os dados demográficos, fisiológicos e clínicos, referentes a todos os indivíduos incluídos neste estudo encontram-se inseridos na Tabela 3.1. Não foi possível obter a mesma informação para o grupo de controlo devido ao tipo de protocolo celebrado com o Instituto Português do Sangue.

Quanto à medicação administrada aos doentes diagnosticados com sepsis é de referir que, de acordo com a informação facultada pela equipa médica do Hospital Beatriz Ângelo, a apenas um indivíduo foi administrada dopamina durante o seu internamento na UCI.

Tabela 3.1- Dados demográficos, fisiológicos e clínicos dos indivíduos incluídos neste estudo

	CTR (n= 20)	AR (n=15)	SEPSIS (n=14)
Género (f/m)	4/16	10/5	5/9
Idade (anos)	-	62±13*	66±14*
IMC (kg/m ²)	-	27±3*	23±4*
Pressão arterial média (mmHg)	-	107±13*	75±18*
Frequência cardíaca (bpm)	-	-	101±22*
Temperatura (°C)	-	-	37±1*

IMC - índice de massa corporal

*Os valores são apresentados em média±desvio padrão

Foram recolhidas amostras de sangue de um total de 14 doentes diagnosticados com sepsis à data da sua admissão na Unidade de Cuidados Intensivos, tendo sido possível recolher o mesmo número de amostras às 24 horas de internamento.

Tabela 3.2 - Dados referentes ao tempo médio de internamento na UCI, ao número de altas do Hospital ou UCI e ao número de mortes no Hospital ou UCI, no que diz respeito aos doentes de sepsis

SEPSIS	
Tempo de Internamento na UCI (dias)	9±14
Alta do Hospital/UCI (n)	7
Mortes Hospital/UCI (n)	4

*Os valores são apresentados em média±desvio padrão excepto de outro modo indicado

Dos 14 doentes iniciais, foi possível recolher amostras de sangue de 7 doentes às 72 horas de internamento e de apenas 4 à data da alta. Este número é bastante reduzido, mas deve-se ter em conta que para 5 indivíduos as 72 horas de internamento coincidiram com a data da alta da UCI.

Em termos de diferentes classes de sepsis, 4 dos 14 indivíduos foram diagnosticados com sepsis, 3 com sepsis grave e 7 com choque séptico. A sepsis, como antes descrito, advém principalmente de infecções no sistema respiratório (pneumonia), infecções intra-abdominais (peritonite) e infecções urinárias, assim como de intervenções cirúrgicas.

Segundo os dados recolhidos no presente estudo, os doentes diagnosticados com sepsis tiveram, em média, 9 dias internados na UCI. Do total de doentes observados, 7 tiveram alta do Hospital/UCI, faleceram 4, três dos quais quando ainda internados na UCI (Tabela 3.2).

Na Tabela 3.3 são apresentados os parâmetros bioquímicos de caracterização clínica dos doentes com sepsis cedidos pela equipa médica do Hospital Beatriz Ângelo. Para comparação, são apresentados também os valores de referência para os mesmos parâmetros clínicos.

Tabela 3.3 - Dados clínicos dos doentes de sepsis, entre os vários momentos do estudo, e valores de referência para indivíduos saudáveis na média de idades do presente estudo

	SEPSIS				Valores de referência ¹
	Admissão	24 Horas	72 Horas	Alta	
Hemoglobina (g/dl)	11714	11771	12155	8250	14-17.5** 12.3-15.3
Leucócitos (/ml)	219214	199285	240666	267500	4400-11300
Plaquetas (/ml)	15,4	16,2	15,9	11,8	154000-386000
Protrombina (seg)	31,7	31,9	23,4	21,5	11.1-13.2
Protrombina parcial activada (seg)	563	645	483	488	22-35
Fibrinogénio Claus (mg/dl)	87	88	77	37	200-400
Ureia (mg/dl)	2,2	1,9	1,6	3,9	16.6-48.5
Creatina sérica (mg/dl)	27,4	53,0	18,9	-	0.2-1

Os valores são apresentados em média.

**Homem/Mulher

¹Valores de referência cedidos pelo Laboratório de Análises Clínicas Celeste Formosinho através da Técnica de Análises Clínicas Vanessa Silva

É possível observar que todos os parâmetros se encontram alterados em relação aos valores de referência. Particularmente, a concentração de leucócitos encontra-se muito acima dos valores normais ao longo de todo o estudo longitudinal, assim como o tempo da protrombina, e o tempo da protrombina parcial activada, embora a primeira diminua gradualmente até à data da alta. Também a concentração de creatina sérica apresenta valores muito acima da média em relação aos valores saudáveis.

Por outro lado, os valores das concentrações do fibrinogénio e da ureia são inferiores aos valores normais, sendo que o primeiro apresenta uma tendência de diminuição ao longo do estudo, enquanto a ureia apresenta a tendência inversa.

3.2. Comparação da explosão oxidativa em neutrófilos entre grupos

Para medir os níveis de condição basal nos três grupos de estudo procedeu-se a um ensaio sem qualquer estímulo adicionado. Este ensaio permite avaliar o estado de activação dos neutrófilos nas amostras de sangue, sem estimulação externa.

Com os dados obtidos por citometria de fluxo, foi possível calcular a percentagem média de neutrófilos positivos para rodamina (células activadas que estão a produzir ROS), cujos resultados se encontram representados graficamente na Figura 3.1.

Para o grupo CTR a percentagem média foi de 90%, enquanto para os grupos AR e Sepsis foram de 76% e 95%, respectivamente. A análise estatística permitiu perceber que a percentagem média de activação de neutrófilos a nível basal não é a mesma entre os três grupos de estudo. Nomeadamente, os doentes com sepsis apresentam maior percentagem média de activação de neutrófilos ($p=0,002$) relativamente aos doentes com artrite reumatóide.

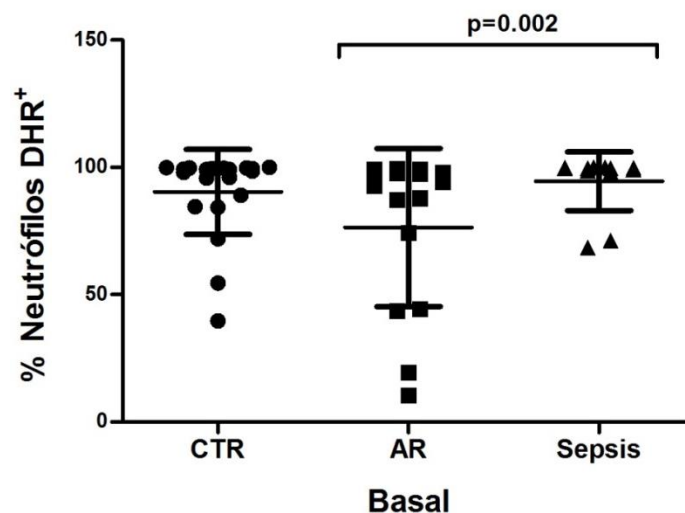


Figura 3.1- Percentagem de neutrófilos produtores de ROS em condição basal nos três grupos de estudo.

3.3. Comparação entre grupos após estimulação com fMLP e PMA

Para além do ensaio em condição basal procedeu-se ao ensaio com estimuladores fMLP e PMA. Da mesma forma que no ensaio acima descrito, foram calculadas as percentagens médias de neutrófilos produtores de ROS, desta feita após a adição dos estimuladores.

Os resultados obtidos para o ensaio com fMLP foram 91% para o grupo CTR, 79% para o grupo AR e 93% para o grupo Sepsis. Estes resultados encontram-se representados na Figura 3.2.

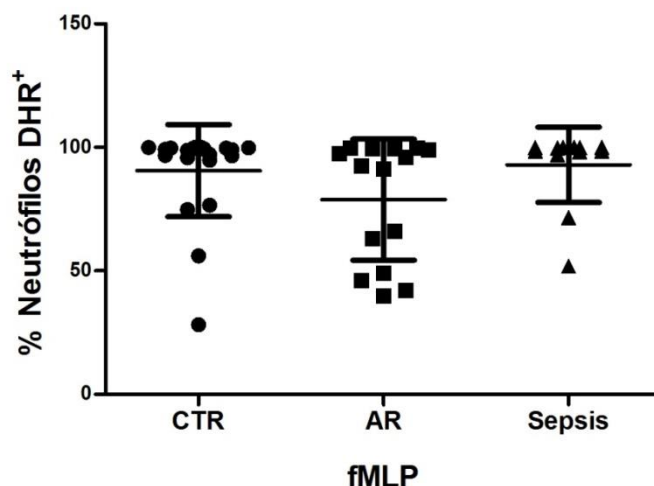


Figura3.2- Percentagem de neutrófilos produtores de ROS após activação com fMLP nos três grupos de estudo.

No caso do activador PMA, para o grupo controlo obteve-se uma percentagem média de 96%, para o grupo AR o valor foi de 93% e para o grupo Sepsis de 99% (Figura 3.3).

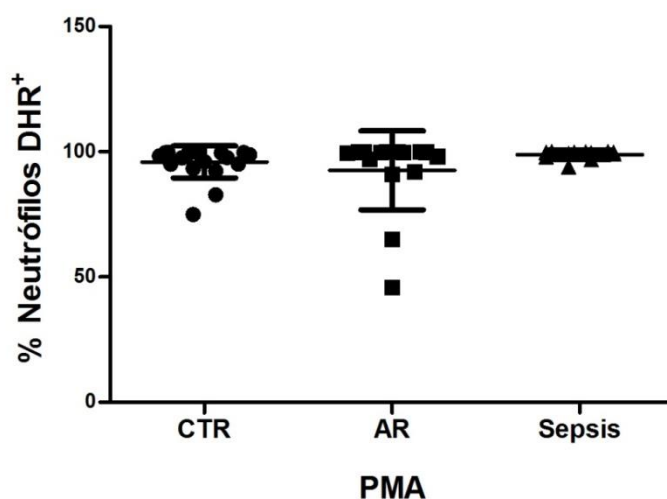


Figura 3.3- Percentagem de neutrófilos produtores de ROS positivos para rodamina após estimulação com PMA nos três grupos de estudo.

Em relação ao ensaio com fMLP os dados estatísticos não são conclusivos, não podendo afirmar ou negar que existem diferenças entre os três grupos de estudo neste ensaio. Por outro lado, a análise estatística de comparação entre os grupos no ensaio de estimulação com PMA não apresenta diferenças estatísticas relevantes.

Comparando a condição basal com os dois estimuladores utilizados, pode-se verificar que existe uma maior percentagem de células a produzir ROS quando adicionado o activador PMA, e que os valores de condição basal e fMLP são, em todos os grupos, idênticos. (Figura 3.4)

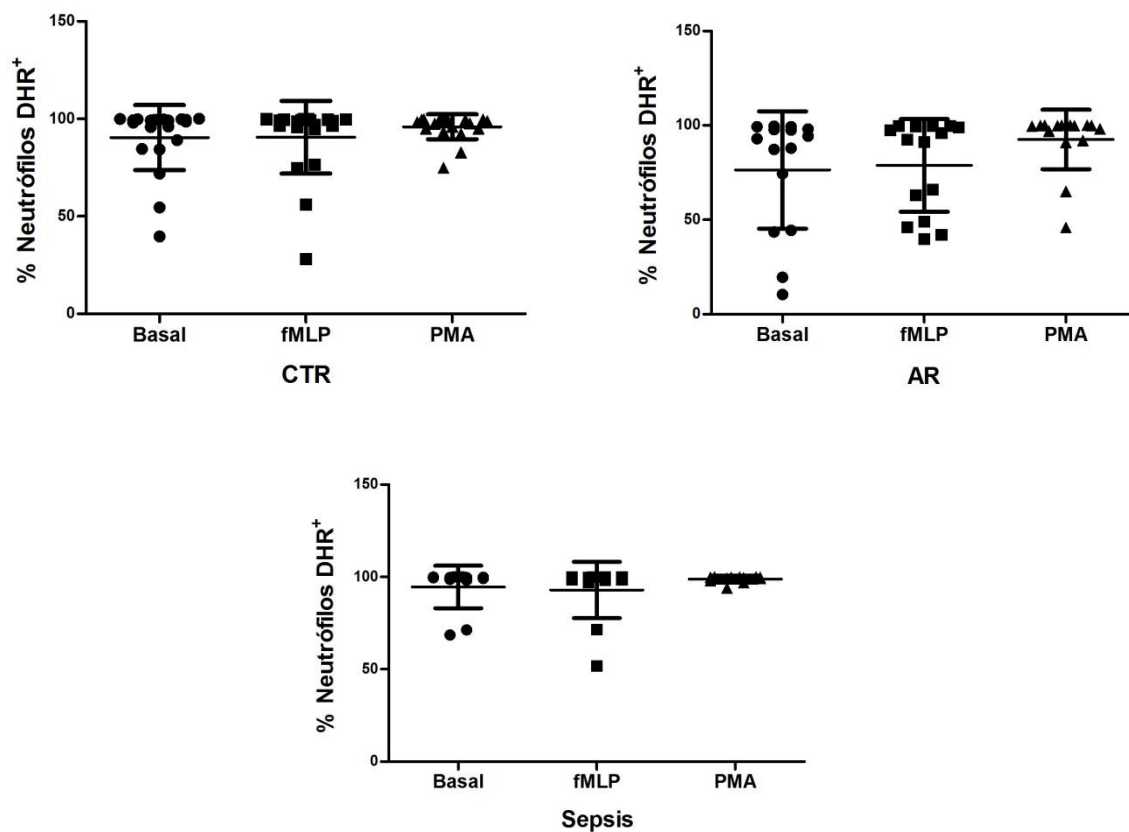


Figura 3.4- Comparação da percentagem de neutrófilos produtores de ROS em condição basal, e com os estimuladores fMLP e PMA para cada grupo de estudo.

3.4. Estudo longitudinal

3.4.1. Condição basal

O ensaio de condição basal, tal como descrito na secção anterior, foi efectuado, tanto quanto possível, em todos os momentos de amostragem, e para todos os doentes com sepsis de modo a permitir uma comparação longitudinal da activação das células no estado de repouso, ou seja, sem a adição de um activador.

À data de admissão na UCI a percentagem média de neutrófilos activados foi de 95%, às 24 horas de internamento 76%, às 72 horas 81% e à data da alta da mesma unidade 86%. Estes resultados estão representados na Figura 3.5.

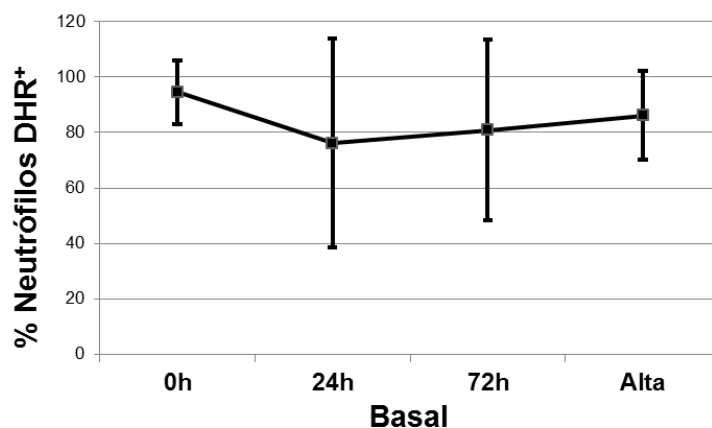


Figura 3.5- Perfil de variação da percentagem de neutrófilos produtores de ROS activados em condição basal em doentes com sepsis ao longo do tempo de internamento na UCI.

A análise estatística concluiu que não existem diferenças significantes no perfil da variação longitudinal entre os níveis basais.

3.4.2. Estimulação com fMLP e PMA

Tal como descrito na secção anterior, após a medição dos níveis basais, procedeu-se à medição dos níveis percentuais médios de produção de ROS pelos neutrófilos, após estimulação com os activadores fMLP e PMA, cujos resultados estão representados graficamente nas Figuras 3.6 e 3.7.

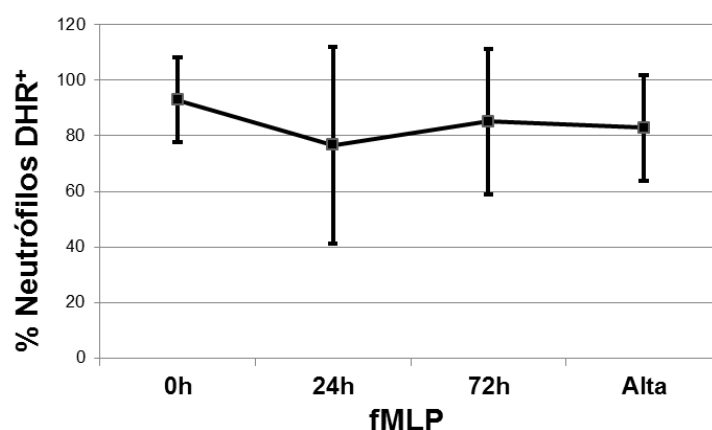


Figura 3.6- Perfil de variação da percentagem de neutrófilos produtores de ROS, após estimulação com fMLP em doentes com sepsis ao longo do tempo de internamento na UCI.

Estatisticamente, não existem diferenças significativas em ambas as estimulações, ao longo do estudo longitudinal.

No caso do ensaio com fMLP os resultados obtidos foram, à data da admissão, de 93%; às 24 horas de internamento 77%, às 72 horas 85% e à data da alta da unidade 83%.

Para a estimulação com PMA os resultados percentuais obtidos foram, para a data de admissão no serviço de 99%, às 24 horas de internamento 98%, às 72 horas 99% e à data da alta de 98%.

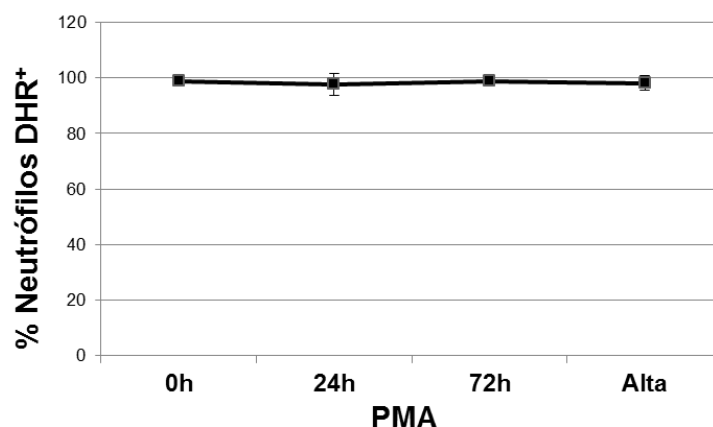


Figura 3.7- Perfil de variação da percentagem de neutrófilos produtores de ROS, após estimulação com PMA, em doentes com sepsis ao longo do tempo de internamento na UCI.

De notar que a escala longitudinal apresentada nos gráficos não representa uma proporcionalidade real, uma vez que o espaço de tempo que está representado entre a primeira e a segunda recolhas não é proporcional em relação aos restantes dois pontos de recolha.

3.5. Análise de prognóstico

Um dos objectivos do projecto em que a presente tese se insere pretendia estabelecer uma relação entre perfis de variação da explosão oxidativa de neutrófilos com o desfecho da doença. Ou seja, pretendia avaliar-se a existência de diferenças na variação ao longo do tempo entre doentes com sepsis sobreviventes e não-sobreviventes, à data da UCI. No entanto, dado o número de doentes que foi possível obter, apesar de todos os esforços, não foi possível aplicar uma análise estatística mais elaborada que permitiria avaliar tais variações. Assim sendo, para tentar melhor compreender a relação entre a actividade dos neutrófilos e o desfecho da doença apresenta-se nesta secção, uma comparação dos perfis médios de activação de neutrófilos em níveis basais, após a estimulação com fMLP e após a estimulação com PMA (Figuras 3.8, 3.9 e 3.10, respectivamente) entre doentes sobreviventes e não-sobreviventes.

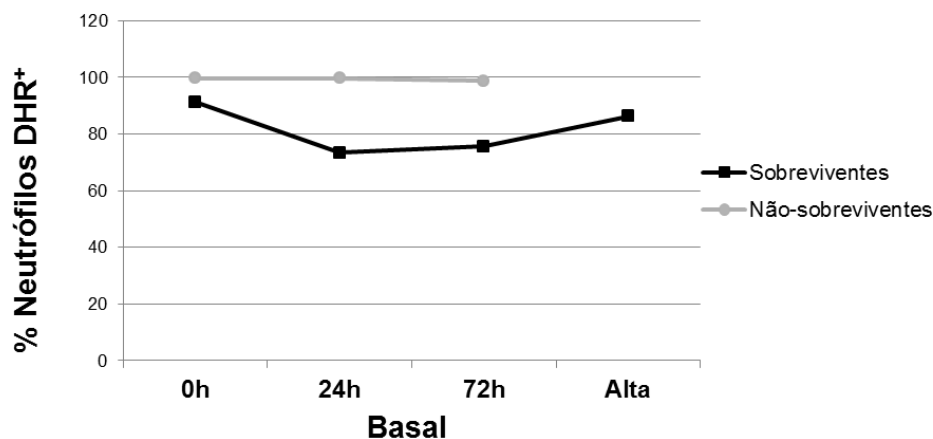


Figura 3.8- Comparação dos perfis de variação longitudinal da porcentagem de produção de ROS em condições basais, entre doentes de sepsis Sobreviventes e Não-sobreviventes.

Em termos basais podemos observar que nos doentes que não sobreviveram os níveis de produção de ROS se mantêm inalterados ao longo do estudo longitudinal, enquanto os níveis daqueles que sobreviveram sofrem uma baixa até às 24 horas de internamento, tendo um ligeiro aumento a partir desse momento.

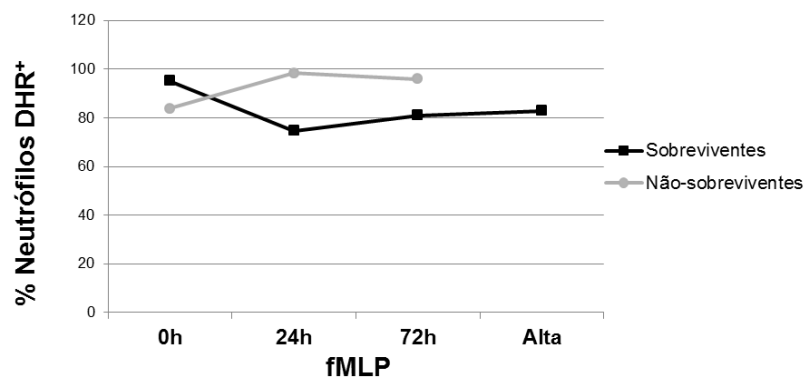


Figura 3.9- Comparação dos perfis de variação longitudinal da porcentagem de produção de ROS após estimulação com fMLP, entre doentes de sepsis Sobreviventes e Não-Sobreviventes.

Em termos comparativos entre os níveis médios de produção de ROS após a estimulação com fMLP observa-se que os perfis de Sobreviventes e Não-sobreviventes são inversos, tendo os primeiros um perfil idêntico àquele descrito no ensaio basal, enquanto os níveis dos doentes não-sobreviventes aumentam até às 24 horas de internamento sofrendo uma ligeira descida a partir desse momento.

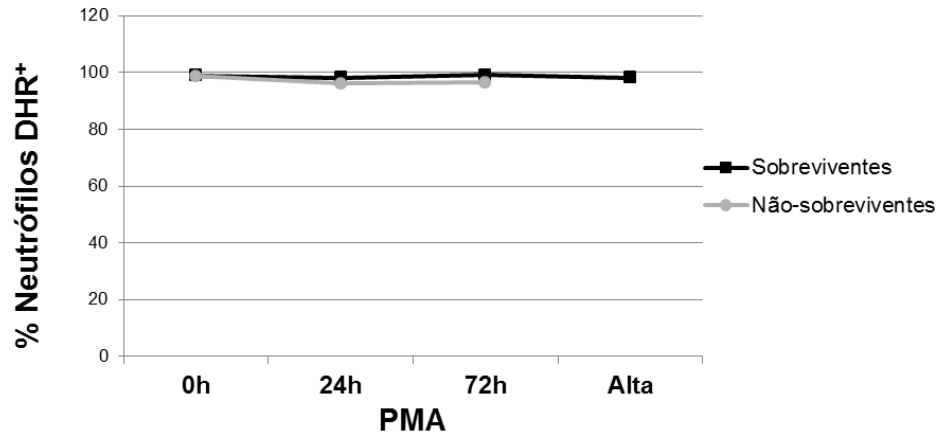


Figura 3.10- Comparação dos perfis de variação longitudinal da percentagem de produção de ROS após estimulação com PMA, entre doentes de sepsis Sobreviventes e Não-Sobreviventes.

Quanto ao ensaio com estimulação por PMA pode observar-se que os níveis médios de espécies reactivas dos doentes não-sobreviventes têm o mesmo perfil daqueles que são observados em doentes sobreviventes.

4. Discussão

Sendo a sepsis uma das principais causas de morte em UCIs por todo o mundo, com uma percentagem entre os 30% e os 70%, é importante continuar a estudar os mecanismos pelos quais esta doença se desenvolve e quais as situações onde um desfecho desfavorável é mais provável para que a intervenção médica seja o mais eficaz possível. Neste trabalho, procurou-se estudar os perfis de produção de ROS nos neutrófilos em doentes com sepsis e qual a sua influência no desfecho da doença. Para atingir o objectivo proposto, é necessário desvendar os efeitos do processo inflamatório e de situação agudas versus crónicas. Assim, foram comparados, os resultados de doentes de sepsis com doentes com artrite reumatóide e com controlos saudáveis.

O presente trabalho permitiu comparar doentes com inflamação aguda com doentes com inflamação crónica, verificando-se que os doentes com artrite reumatóide apresentam uma menor percentagem média de neutrófilos produtores de ROS, em relação aos doentes de sepsis e aos controlos. Os resultados parecem assim apontar para que em condições basais numa situação de doença inflamatória crónica existam menos neutrófilos produtores de ROS.

Em relação ao estudo longitudinal nos doentes com sepsis verificou-se uma baixa na percentagem média de produção de ROS, em níveis basais, entre a data da admissão e as 24 horas de internamento, voltando a aumentar ligeiramente a partir desse momento.

Este estudo pretendia também procurar uma associação entre o perfil de variação longitudinal da percentagem de neutrófilos produtores de ROS em doentes com sepsis e o desfecho desfavorável da doença. Apesar do número limitado de doentes incluídos no estudo, foi possível verificar que, nos doentes não-sobreviventes, ocorreu uma alteração ao perfil longitudinal acima descrito, mantendo-se a percentagem de neutrófilos DHR⁺ sempre muito próxima dos 100%, não ocorrendo variação longitudinal.

Os neutrófilos são a primeira linha de defesa do organismo, encontrando-se numa forma latente em indivíduos saudáveis. São recrutados para ao local de lesão por um processo denominado quimiotaxia, onde componentes do microrganismo invasor e produzidos também pelas células dos tecidos do hospedeiro permitem a sua activação e migração para o local, provocando uma resposta inflamatória.

A resposta inflamatória é resultado de um número de acções das células, nomeadamente a produção de ROS, que contribuem para a eliminação dos microrganismos patogénicos, no entanto podem também eles serem causa de dano, e muitas vezes serem responsáveis pelo desenvolvimento de doenças inflamatórias.

A dihidrorodamina 123 é um composto não fluorescente, que passa a membrana celular e, quando existe o mecanismo adequado, oxida em rodamina 123, o seu produto fluorescente que quando em

contacto com uma fonte de luz fluoresce a verde. É usada na citometria para estudar a produção de ROS, neste caso pelos neutrófilos.

Martins e colaboradores (2008) já tinham publicado resultados idênticos aos obtidos no presente trabalho, comparando os níveis basais entre grupos de sepsis e um grupo de controlo saudável referindo que, em casos de sepsis, os níveis de produção de ROS estão aumentados. (Martins *et al.* 2008)

O stress oxidativo, típico dos casos de sepsis, parece resultar de um desequilíbrio entre a formação e neutralização de radicais livres (produzidos pelos neutrófilos), Mühl e colaboradores (2011) estudaram a presença de marcadores pro-oxidação e a presença de anti-oxidantes e concluíram que existe stress oxidativo severo e capacidade anti-oxidante diminuída em doentes com sepsis, à data da sua admissão nas unidades de cuidados de saúde.

É de referir que durante o processo da doença existe uma activação das respostas imunes sistémicas devido à libertação de grandes níveis de DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) por parte dos microorganismos invasores e/ou pelos tecidos danificados do hospedeiro, o que leva a uma sobre-estimulação das células imunitárias (Rittirsch *et al.*, 2008) e que daí resulta o referido desequilíbrio, também chamado “*citokine storm*”.

Sabe-se que os níveis de ROS estão aumentados, em casos de sepsis, de forma constitutiva e que esse facto indica a indução, por um evento séptico, da “upregulation” do metabolismo oxidativo em neutrófilos (Martins *et al.*, 2003). Isto pode explicar o perpetuar do episódio inflamatório no tempo em casos de sepsis, como também os resultados obtidos na presente tese de mestrado. Verificou-se que os níveis de produção de ROS estão entre os 98% e os 100%, e portanto aumentados em relação aos restantes grupos de estudo, apesar de as diferenças estatísticas não serem sempre significativas, o que poderá estar relacionado com o número de doentes incluídos no estudo.

Um estudo feito em 2002, *in vitro*, mostrou que nas primeiras horas da infecção (<24 horas) os neutrófilos se encontram “prontos” e hiperactivados. O mesmo estudo mostrou que a partir das 48 horas de infecção, as células perdem algumas das suas capacidades (respostas quimiotácticas, libertação de enzimas, entre outras) aumentando o risco de persistência da infecção. (Huber-Lang *et al.*, 2002)

Alguns estudos referem, ainda, uma “paralisia imunitária” por parte dos neutrófilos em estados mais avançados de sepsis, resultado num “*shut-down*” completo de importantes vias de sinalização. Alguns autores consideram que esse processo possa ser uma das causas de morte em casos de sepsis em estadios mais graves. (Rittirsch *et al.*, 2008) Esta imunossupressão pode ser devida a um mecanismo de feedback negativo, em que o corpo desenvolve uma resposta anti-inflamatória de forma a contrariar os efeitos de uma resposta inflamatória exacerbada, sendo benéfica nas primeiras horas da infecção mas tendo um desfecho fatal à medida que se prolonga no tempo. (Venet *et al.*, 2011)

Os resultados obtidos neste trabalho não foram conclusivos quanto a esta “falha imune” por parte dos neutrófilos, mas podem explicar as alterações das percentagens médias de produção de ROS observadas durante o estudo longitudinal, nomeadamente a baixa nas percentagens médias entre a data da admissão e as 24 horas de internamento. Sendo que o corpo tenta contrariar a resposta inflamatória exacerbada que se desenvolve nas primeiras horas da infecção.

As diferenças observadas entre AR e sepsis, em que os primeiros doentes mostram níveis basais mais baixos em relação ao segundo grupo, e até em relação aos controlos, podem ser explicados pela administração de terapêutica anti-inflamatória uma vez que esta doença é crónica e é controlada através da administração deste tipo de medicação, sendo que muitas vezes é feita em combinação com outros medicamentos. A primeira linha de tratamentos é terapêutica inibidora de TNF- α . (Wasserman 2011)

Foi demonstrada em modelos animais e humanos de AR, uma produção excessiva de TNF em locais de inflamação, atribuindo-lhe assim um papel importante na patologia da doença e fazendo do TNF um bom alvo terapêutico. (di Giovine *et al.*, 1988)

Existem, na Europa, cinco inibidores de TNF para o tratamento da AR, sendo estes anticorpos monoclonais ou proteínas de fusão, mas todos são capazes de se ligar a TNF e inibir os seus efeitos fisiológicos.

Estes agentes são absorvidos para locais de inflamação, e penetram na articulação inflamada para o que contribuem as características do próprio fenómeno de inflamação, como aumento da vascularidade e permeabilidade endotelial.

Dos cinco agentes anti-TNF utilizados, apenas um não contém o fragmento Fc da imunoglobulina humana IgG1. A presença deste fragmento permite a ligação aos receptores Fc (presentes em células imunitárias), tendo estes um papel crucial na função imunitária das células onde se encontram. Esta ligação induz, *in vitro*, vários efeitos celulares pelos quais são responsáveis os receptores Fc, tais como aumento da opsonização ou imunogenicidade. (Mewar e Wilson, 2011)

Estudos em modelos animais apontam para um papel crucial na patologia da AR de anti-corpos presentes no soro de doentes, principalmente dos chamados Factores Reumatóides (RF). Estes anti-corpos reconhecem a porção Fc das IgG e aumentam a formação de complexos imunes.

Os receptores para Fc, Fc γ (Fc γ R) reconhecem especificamente a mesma porção, estando presentes em grande número na superfície dos neutrófilos. É provável que a activação destes receptores, pelos complexos imunes, nos neutrófilos tenha um papel importante na cronicidade e gravidade da doença, uma vez que pode levar a uma acção desadequada por parte destas células. Assim, é de esperar que a terapêutica actue nestes receptores, de forma a controlar e impedir o progresso da doença. (Rollet-Labelle *et al.*, 2013)

A acção deste mecanismo explica então os resultados obtidos no presente trabalho.

Mais recentemente foi descoberta uma nova quimiocina que modula especificamente a quimiotaxia e activação de macrófagos e células dendríticas (células envolvidas na patologia de AR), denominada quemerina. (Wittamer *et al.*, 2004) Sabe-se que as células endoteliais e as células do revestimento e subrevestimento sinovial expressam esta quimiocina e que um dos seus receptores,

ChemR23, é também expresso pelas células endoteliais da vasculatura, sendo regulado por citocinas pró-inflamatórias, como o TNF. (Kaneko *et al.*, 2011)

Estas observações levam a crer que a quemerina está envolvida na patologia de AR provocando mudanças nas células endoteliais e no aumento da morbidade vascular.

Uma vez envolvido na regulação de um dos receptores para a quemerina, Herenius *et al.*, 2013 estudaram o efeito da medicação anti-TNF nos níveis de quemerina em doentes de AR. O que foi observado foi que de facto este tipo de terapêutica reduz os níveis de quemerina no soro.

O reduzido número de macrófagos associados à terapêutica anti-TNF está ligado a uma melhoria do estado de saúde dos doentes de AR, assim e como a quemerina é um potente agente quimioattractante para macrófagos, o efeito positivo deste tipo de terapêutica pode dever-se, parcialmente, à redução dos níveis da mesma e à conseqüente redução do número de macrófagos sinoviais.

Uma vez que se sabe que fumar é um dos factores de risco para desenvolver AR é interessante referir que, no mesmo estudo, observou-se que o tabaco pode elevar os níveis de quemerina. Em ratos *knockout* para o receptor ChemR23, expostos a fumo de tabaco, verificou-se um número menor de células inflamatórias recrutadas. Desta forma, o facto de que fumar é um grande factor de risco para AR, pode dever-se ao aumento da produção de quemerina decorrente do mesmo, e do seu mecanismo fisiológico.

Em relação às diferenças entre estimulantes de neutrófilos, sabemos que o modo de activação entre os dois estimulantes utilizados não é o mesmo. A acção do PMA causa agregação de neutrófilos, geração de superóxido, secreção de enzimas e fosforilação de vários polipéptidos, aumentando as suas capacidades de acção. Esse processo dá-se devido à activação directa pelo PMA da proteína cinase C. (Hoult & Nourshargh 1985) Dadas as suas propriedades de activação de neutrófilos, os resultados referentes aos ensaios com estimulação PMA são de acordo com o esperado uma vez que apresentam uma percentagem média de produção de ROS acima dos outros ensaios efectuados.

Em relação ao fMLP, é considerado um potente factor quimiotáctico, que através da sua ligação a receptores na membrana das células acoplados a proteínas G, activa uma série de vias de sinalização intracelulares. (Sato *et al.*, 2013) Esta característica de activação indirecta torna-o um estimulante mais fraco que o PMA, mostrando por vezes até uma activação menor que em níveis basais, sendo no entanto um estimulador “mais fisiológico”.

Por outro lado, as diferenças entre ambos, podem também ser explicadas por dois factores, enquanto a estimulação por fMLP é de curta duração e há uma produção intensiva de superóxido (O_2^-), a resposta dos neutrófilos à estimulação por PMA é de longa duração, podendo manter-se até 8 horas após a estimulação e onde H_2O_2 parece ter um papel importante. (Geffner *et al.*, 1991) Uma vez que H_2O_2 é responsável pela oxidação da DHR 123 (fluorocromo utilizado na citometria, ver Anexo II) na sua forma fluorescente, rodamina (Henderson & Chappell, 1993), este facto em conjunto com a produção de ROS perpetuada no tempo, pode explicar a estabilidade dos resultados em

relação à estimulação por PMA, assim como os seus valores de percentagens médias de activação, em relação aos outros ensaios.

Em relação à análise de prognóstico, os resultados obtidos na presente tese de mestrado parecem indicar que o prognóstico é tanto mais favorável quanto menor for a diferença observada nos níveis de produção de ROS, entre a data de admissão e as 24 horas de internamento. Ou seja, pode-se esperar que haja uma diminuição da mesma produção entre esses dois períodos em doentes com prognóstico mais favorável. Por outro lado, quando se observa uma percentagem média de neutrófilos activados, perto dos 100% com tendência para se perpetuar no tempo, é possível um desfecho da doença menos favorável, ou seja, a morte.

Não existe um grande número de estudos que relacione a produção de ROS ao desfecho da doença.

De referir, um estudo mostrou não haver relação entre os níveis basais, com estimulação fMLP e com estimulação PMA de activação de neutrófilos, entre indivíduos sobreviventes e não-sobreviventes. (Martins *et al.*, 2003)

É difícil de explicar o resultado obtido na estimulação por fMLP, uma das hipóteses será o número de indivíduos não-sobreviventes que, sendo baixo, não permite uma observação de resultados proporcionais, uma vez que o resultado para os sobreviventes está de acordo com o esperado, assemelhando-se ao resultado obtido no ensaio basal. O resultado esperado para os não-sobreviventes no mesmo ensaio seria idêntico àquele observado para os sobreviventes, uma vez que o perfil se manteve idêntico noutros ensaios, ou seja, os resultados obtidos para a estimulação com fMLP foram, em todos os estudos efectuados no presente trabalho, idênticos àqueles obtidos para os níveis basais. Sendo que, na análise de prognóstico, isso mesmo se verifica para os sobreviventes, mas não para os não-sobreviventes.

Esses mesmos resultados, da semelhança entre níveis basais e estimulação com fMLP, talvez se devam ao facto deste último ser um fraco estimulador da actividade dos neutrófilos, e de se assemelhar a um estimulador endógeno.

5. Conclusão

No que diz respeito á patologia da sepsis, uma das principais causas de morte em Unidades de Cuidados Intensivos, é importante perceber o que difere nos indivíduos que sobrevivem em relação aqueles que não sobrevivem de modo a que a acção médica seja em tempo útil e previna desfechos menos favoráveis. Esse foi o principal objectivo do trabalho desenvolvido, através do estudo da produção de espécies reactivas de oxigénio, tendo a ambição de fazer um prognóstico o mais correcto possível e de estipular um intervalo de tempo que permita aos médicos intervir o mais precocemente possível, de forma a impedir um desfecho fatal.

Apesar dos resultados obtidos não serem conclusivos de uma forma que permita preencher o objectivo proposto na sua totalidade, no entanto, podemos dizer que o prognóstico é tão mais favorável quanto menor for a diferença dos níveis de ROS entre a admissão na UCI e as 24 horas de internamento, sendo que esta sofre uma descida entre esse período de tempo.

O perfil que indica um desfecho desfavorável para doentes de sepsis corresponde aquele em que os níveis se mantêm nos 100% ao longo do estudo longitudinal.

A análise estatística não foi significativa, mas estes resultados já permitem fazer associações empíricas e propor linhas de investigação a serem aprofundadas.

5.1. Limitações do estudo

Quanto a limitações a este estudo, a mais flagrante será o reduzido número do grupo de doentes de sepsis. Apesar dos esforços feitos o número de doentes de sepsis incluídos no estudo foi muito baixo, não tendo permitido obter conclusões definitivas sobre o objectivo proposto para esta investigação. A inclusão de doentes no estudo foi da responsabilidade da equipa médica do Hospital Beatriz Ângelo; factores de exclusão e questões logísticas como obtenção de consentimento e limitações decorrentes do funcionamento do próprio serviço hospitalar condicionaram sobremaneira o aumento do número de doentes com sepsis. De forma a que a constituição dos grupos fosse homogénea, tentou-se incluir nos restantes grupos de estudo um número aproximado de indivíduos. Outra limitação do estudo relaciona-se com o funcionamento do citómetro de fluxo, cuja manutenção e/ou avarias condicionou, tendo por vezes impossibilitado, a realização dos ensaios.

5.2. Perspectivas futuras e implicações

Quanto a perspectivas futuras, seria importante continuar com este estudo para entender realmente o papel dos neutrófilos e da sua acção na patologia da sepsis, sendo que estes podem ser potenciais alvos clínicos. "(...) a eliminação total de neutrófilos levaria à morte, mas alterações ou modificações das suas acções pode ter, potencialmente, benefícios clínicos(...)" ((Phillipson e Kubesh

2011), estes dados são apoiados por estudos que mostram que, por exemplo, os corticosteróides inibem a desgranulação e produção de ROS por parte dos neutrófilos, diminuem os mediadores inflamatórios e previnem a adesão e migração dos neutrófilos para as articulações com AR, o que poderia ser aplicado a modelos de sepsis. (Smith *et al.*, 2000)

Para complementar este trabalho, estava previsto o estudo dos níveis de várias citocinas pró- e anti-inflamatórias no soro dos doentes de sepsis, indo ao encontro da etiologia da doença e a forma como esta se desenvolve nos vários quadros da mesma. No entanto, devido a constrangimentos financeiros não foi possível, sendo uma sugestão para estudos futuros.

Em 2007, um estudo mostrou que a inibição da utilização do oxigénio celular e outras vias metabólicas pode levar a diminuição da produção de ROS por parte da população de células disfuncionais. (Brien *et al.*, 2007)

Recentemente foi estabelecida uma relação entre a utilização clínica de selénio em pacientes com sepsis severa e choque séptico, e a sua sobrevivência. Utilizando o selénio como terapia adjuvante a morte por sepsis é reduzida, sendo que existe uma correlação directa entre a quantidade de selénio no sangue total e a taxa de sobrevivência. Ainda assim, o mesmo estudo aponta que não são necessárias doses altas, mas que o selénio é eficaz mesmo em doses mais baixas (Angstwurm *et al.*, 2007) Esta seria uma boa linha de estudo para casos de sépsis, de forma a entender o papel do selénio na doença e desenvolver novas terapias que permitam reduzir a mortalidade resultante desta doença.

Resumindo, a sepsis deve continuar a ser um alvo das investigações científicas, tanto no que diz respeito à sua etiologia como no tratamento clínico, de forma a entender melhor como se sucede e em que altura e “onde” a intervenção médica será mais eficaz.

6. Referências

1. Angstwurm, M.W. *et al.*, 2007. Selenium in Intensive Care (SIC): results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock. *Critical care medicine*, 35(1), pp.118–26.
2. Arosa F., Cardoso E. e Pacheco F. 2007. Imunidade Inata e Adaptativa. Fundamentos de Imunologia (Pacheco F. e Cardoso E.), pp:35-59, LIDEL, Lisboa
3. Angus D.C. e Poll T., 2013. Severe Sepsis and Septic Shock. *The New England Journal of Medicine*, 369(9), pp. 840-851
4. Brien, J.M.O. *et al.*, 2007. Sepsis. *The American Journal of Medicine*, 120: pp.1012–1022.
5. Biology1152 Principles of Biological Science-
www.bio1152.nicerweb.com/Locked/media/ch43/inflammation.html/7.09.2013
6. Cook H. e Botto M., 2006. Mechanisms of Disease: the complement system and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews Rheumatology*, 2, pp. 330–337.
7. Ehrnthaller C. *et al.*, 2012. Alteration of complement hemolytic activity in different trauma and sepsis models. *Journal of Inflammation Research*, 5, pp. 59-66
8. Geffner, J.R. *et al.*, 1991. Neutrophil erythrotoxicity induced by phorbol myristate acetate: mechanisms involved in neutrophil activation. *Journal of leukocyte biology*, 49(4), pp.352–359.
9. Hoult, J.R. e Nourshargh, S., 1985. Phorbol myristate acetate enhances human polymorphonuclear neutrophil release of granular enzymes but inhibits chemokinesis. *British journal of pharmacology*, 86(3), pp.533–7.
10. Henderson, L.M. & Chappell, J.B., 1993. Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *European journal of biochemistry / FEBS*, 217(3), pp.973–80.
11. Huber-Lang, M.S. *et al.*, 2002. Complement-induced impairment of innate immunity during sepsis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(6), pp.3223–31..
12. Herenius M. *et al.*, 2013. Anti-TNF Therapy Reduces Serum Levels of Chemerin in Rheumatoid Arthritis: A New Mechanism by Which Anti-TNF Might Reduce Inflammation. *PLoS ONE*, 8(2), pp. 1-5.
13. Kaneko K. *et al.*, 2011. Chemerin activates fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 13:R158, pp.1-14.
14. Karlson E. W. e Deane K, 2013. Environmental and gene-environment interactions and risk of rheumatoid arthritis. *Rheumatic diseases clinics of North America* 38(2), pp.405–426.

15. Lawrence *et al.*, 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 2, pp. 787-795.
16. Ley K. *et al.*, 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, 7, pp. 678-689.
17. Martins, P.S. *et al.*, 2003. Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock*, 20(3), pp.208–12.
18. Martins, P., Brunialti, M. e Martos, L., 2008. Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis. *Critical Care*, 12(1).
19. Mourão A., *et al.*, 2010. From a Neutrophilic Synovial Tissue Infiltrate to a Challenging Case of Rheumatoid Arthritis. *Acta Reumatológica Portuguesa*, 35, pp.228-231.
20. Mewar, D. e Wilson, A.G., 2011. Treatment of rheumatoid arthritis with tumour necrosis factor inhibitors. *British journal of pharmacology*, 162(4), pp.785–91.
21. Mühl D. *et al.*, 2011 Comparison of oxidative stress & leukocyte activation in patients with severe sepsis & burn injury. *Indian Journal of Medical Research*, 134, pp.69-78.
22. Weinmann P. *et al.*, 2007. Delayed neutrophil apoptosis in very early rheumatoid arthritis patients is abrogated by methotrexate therapy. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 25, pp. 885-887.
23. Ormerod M.G. 1999. Flow Cytometry. 2ª edição, BIOS Scientific Publishers
24. Ormerod M.G. 2005. Flow Cytometry- Pratical Approach. 3ª edição, Oxford University Press
25. Pinto, A. 2009. Resposta Inflamatória. Fisiopatologia- Fundamentos e Aplicações(A. Pinto e M.Rosa), pp: 185-218. LIDEL, Lisboa
26. Phillipson, M. e Kubes, P., 2011. The neutrophil in vascular inflammation. *Nature medicine*, 17(11), pp.1381–90.
27. Rittirsch, D., Flierl, M. a & Ward, P. a, 2008. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nature reviews. Immunology*, 8(10), pp.776–87.
28. Rollet-Labelle, E. *et al.*, 2013. Cross-linking of IgGs bound on circulating neutrophils leads to an activation of endothelial cells: possible role of rheumatoid factors in rheumatoid arthritis-associated vascular dysfunction. *Journal of inflammation (London, England)*, 10(1), p.27.
29. Sadik, C.D., Kim, N.D. & Luster, A.D., 2011. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in Immunology*, 32(10), pp.452–460.
30. Sato, T. *et al.*, 2013. Molecular mechanisms of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced superoxide generation and degranulation in mouse neutrophils: phospholipase D is dispensable. *Molecular and cellular biology*, 33(1), pp.136–45.
31. Smith, M.D., Roberts-Thomson, P.J. & Ahern, M.J., 2000. The role of intravenous methylprednisolone pulses in the management of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*, 39(11), pp.1296–7.
32. Venet, F., Lepape, A. & Monneret, G., 2011. Clinical review: flow cytometry perspectives in the ICU - from diagnosis of infection to monitoring of injury-induced immune dysfunctions. *Critical care (London, England)*, 15(5), p.231.

33. Wright, H.L. *et al.*, 2010. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford, England)*, 49(9), pp.1618–31.
34. Wasserman, A.M., 2011. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *American family physician*, 84(11), pp.1245–52.
35. Wingeyer S. *et al.*, 2012. Biomarkers in sepsis at time zero: intensive care unit scores, plasma measurements and polymorphisms in Argentina. *Journal of Infection in Developing Countries*, 6(7), pp. 555-562

Anexo I

1. CITOMETRIA DE FLUXO

A Citometria de Fluxo é uma técnica que realiza medições rápidas em partículas ou células à medida que estas fluem, uma a uma numa corrente.

Para realizar esta técnica é necessária a preparação de uma amostra, mais precisamente uma suspensão de partículas, marcadas de forma específica. As partículas analisadas podem ser células inteiras, organelos celulares ou partes específicas de tecidos (ex.: Ilhas de Langerhans). Se o objectivo for estudar uma população de glóbulos brancos então é necessário lisar os eritrócitos da amostra de sangue.

A amostra é injectada no sistema fluídico do citómetro (ficando sobre pressão), que tem como objectivo levar as partículas presentes na suspensão, para o ponto específico onde será intersectado por uma fonte luminosa.

É necessária uma iluminação intensa dado que as células têm um tamanho reduzido e que a sua passagem pelo ponto de detecção é feita rapidamente. Assim, a fonte de luz tem de ser capaz de produzir comprimentos de onda específicos que possam ser usados para excitar marcadores fluorescentes.

Preferivelmente usam-se lasers como fonte de iluminação dado que produzem luz monocromática, assim como o seu feixe é coerente, polarizado, intenso e estreito. Adicionalmente os seus comprimentos de onda podem ser escolhidos especificamente.

O feixe de luz tem de estar focado na corrente da amostra, isto é possível através de uma lente simples, dando ao feixe uma secção cruzada de, tipicamente, 50 μm .

À medida que as células passam através do feixe de luz, os detectores transformam a intensidade da luz em voltagem, para cada um de três parâmetros: forward scatter, side scatter e fluorescência.

Quando a luz incide numa célula, esta reflecte-a (scatter) em todos os ângulos. Forward scatter (FS) diz respeito à luz que é dispersa para a frente em relação ao laser, sendo que este parâmetro indica aproximadamente o tamanho da célula. Uma barra - barra de obscuração- é colocada em frente ao “detector forward” de forma a prevenir que a luz directa e intensa do laser seja detectada pelo mesmo, a luz é então reflectida à volta da barra de obscuração e assim detectada correctamente.

A magnitude do sinal obtido é proporcional ao tamanho da células, células mais pequenas têm uma voltagem mais baixa e portanto menor magnitude de sinal enquanto células maiores têm maior magnitude de sinal.

A luz que é reflectida para os lados e em ângulos maiores é denominada *side scatter* (SS), e diz respeito a aspectos internos da célula, como sejam a granulosidade. Este tipo de dispersão da luz é focado através de um sistema de lentes e é detectada por um detector diferente daquele que detecta FS, geralmente colocado num ângulo de 90° em relação ao feixe do laser.

O histograma resultante da análise FS é uma representação gráfica do tamanho das células de uma população, no entanto este apenas apresenta dados unidimensionais. Da mesma maneira, o histograma resultante da análise SS apresenta dados unidimensionais, dividindo, no entanto, as células consoante a sua complexidade interna (ex.: presença de grânulos).

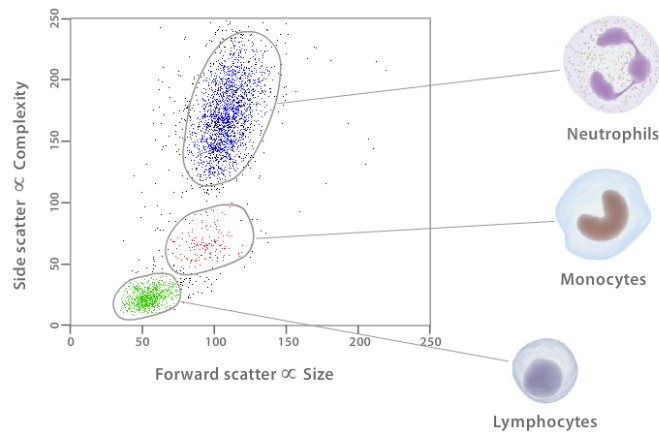


Figura I.1- *Dot plot* de uma amostra de sangue total.

Nenhum destes histogramas é capaz de demonstrar a complexidade da população de células, ou seja, não são capazes de demonstrar os tipos de células que fazem parte da população presente na amostra. Para isso utilizam-se gráficos de pontos de duas dimensões (designados por *dot plots*), que juntam tanto a análise SS como a análise FS, sendo assim possível distinguir os diferentes tipos de células mediante a sua posição no gráfico em relação a FS vs. SS (análise multiparamétrica; Figura 1).

Cada ponto no *dot plot* representa uma célula, e este contém toda a informação a ela associada referente a FS e a SS. Desta forma podemos limitar regiões de interesse (ou populações específicas de células) para análise de outros parâmetros referentes a essas populações, esta análise direccionada denomina-se *gating* e a área seleccionada *gate*.

Outra forma de análise é a fluorescência. De uma forma geral, a luz emitida por células marcadas com fluorescência faz o mesmo caminho que o sinal SS (num ângulo de 90° em relação ao feixe de luz do laser) e é direccionada através de um conjunto de filtros e espelhos para que comprimentos de onda específicos (ou seja de diferentes cores) sejam captados pelos detectores correctos.

Existem duas categorias de sondas fluorescentes usadas em citometria:

- Aquelas que são usadas para marcar covalentemente outras sondas;
- Aquelas cuja fluorescência ou distribuição reflectem o seu ambiente e potenciam propriedades particulares da célula.

Um fluoróforo só absorverá luz se estiver correctamente orientado relativamente ao plano de polarização da luz do laser.

Em relação ao fluoróforos usados para marcar covalentemente outras sondas pode dizer-se que a sonda a ser marcada é comumente um anticorpo, podendo no entanto ser outro tipo de proteína.

Neste tipo de marcação o anticorpo é previamente marcado covalentemente com uma sonda fluorescente. Posteriormente o anticorpo será incubado com a população de células a estudar ocorrendo uma ligação específica entre o anticorpo e uma molécula específica na superfície da célula (antigénio) ou no seu interior. Quando o fluoróforo é exposto ao feixe de luz do laser emite um sinal fluorescente que é então detectado pelos detectores do citómetro.

Neste caso, o mais utilizado é a fluorescina, a qual tem um coeficiente de extinção elevado, um máximo de absorção convenientemente perto das linhas de emissão das fontes de luz e está largamente disponível para se ligar a vários anticorpos e outras sondas.

A segunda categoria de fluoróforos diz respeito àqueles que são usados para marcar directamente componentes celulares. Estes são compostos obtidos como estéres acetil ou estéres acetoximetil não carregados que atravessam livremente a membrana celular e que na sua forma original não emitem fluorescência. No interior das células, as esterases (enzimas) removem os grupos acetil/acetoximetil libertando o parente fluorescente. Assim, o componente carregado permanecerá no interior da célula e será detectado de forma idêntica às sondas acima descritas.

Neste caso inclui-se a dihidro- rodamina 123, que é oxidada para rodamina 123, especificamente marca mitocôndrias e fluoresce a verde. É amplamente utilizada para seguir a produção intracelular de espécies oxidativas (burst oxidativo em neutrófilos).

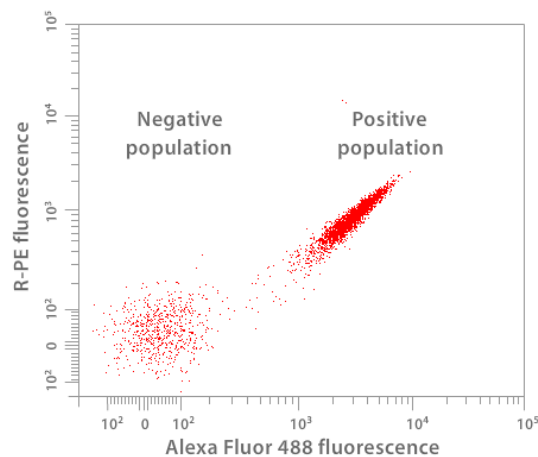


Figura I.2- Sobreposição de espectros entre dois fluoróforos (R-PE e Alexa Fluor 488).

É possível utilizar mais do que uma marcação numa só experiência. Neste caso é preciso ter em conta o comprimento de onda (ou seja a cor) em que emitem os vários fluoróforos, para que haja o mínimo de sobreposições (*spectral overlap*) possível e que a análise seja o mais correcta possível.

Quando são usados dois fluoróforos cujos espectros de emissão se sobrepõem ligeiramente, pode proceder-se a uma correcção denominada Compensação, que pode ser diferente para cada um dos fluoróforos mediante a quantidade de luz que se sobrepõe entre um e outro. Para saber a quantidade de compensação necessária para corrigir a fluorescência são necessárias amostras de *single-color*,

ou seja, com apenas um fluoróforo separadamente. Na prática, quando obtemos o *dot plot* resultante da marcação pode ver-se uma população positiva e uma população negativa (Figura 2), dizendo a primeira respeito à população em que há sobreposição. Assim, para corrigir esta sobreposição, subtrai-se uma percentagem de um dos fluoróforos ao outro (no exemplo será R-PE - % Alexa Fluor 488) até que as populações se igualem (relativamente).

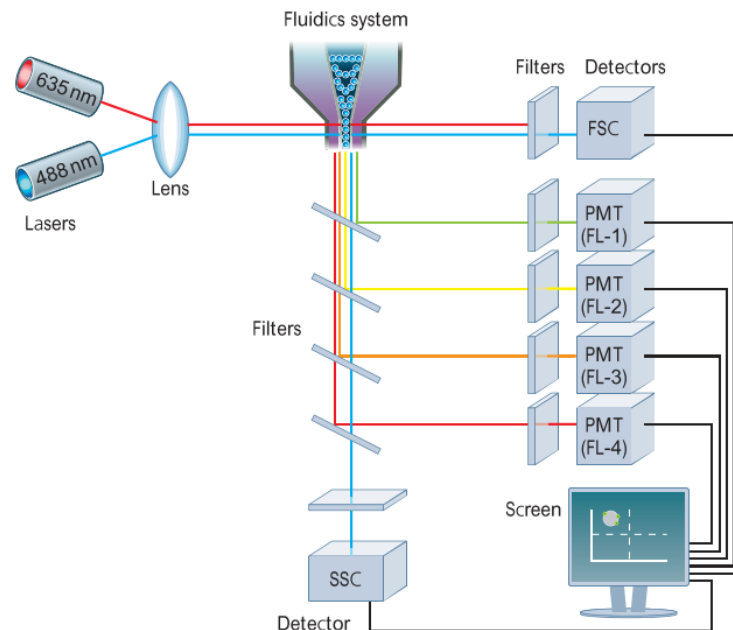


Figura I.3- Esquema de um citômetro de fluxo.

2. SETTINGS

Na primeira sessão de leitura é necessário formatar as definições de voltagens e compensação das fluorescências (*settings*) para que o aparelho reconheça os sinais de fluorescência e para evitar que haja sobreposições de sinal, como acima descrito.

Assim, além do processo acima descrito para as amostras foi necessário fazer mais dois ensaios extra para os *settings* da citometria:

	Sangue total	HBSSi
Single staining DHR123	100µl	20µl
Single staining CD16-PerCp	100µl	20µl

O procedimento laboratorial para processar estas amostras extra seguiu o método referido para as restantes amostras.

Anexo II

1. CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DAS CLASSES DE SEPSIS

a- Critérios de Inclusão

O grupo de estudo dividiu-se em 3 grupos principais: sépsis, sépsis severa e choque séptico, definidos como:

- Sépsis: paciente com Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica (SIRS) devido a infecção ou suspeita da mesma. Este é definido com pelo menos dois dos aspectos seguintes:

- a) Temperatura corporal acima dos 38°C ou abaixo dos 36°C;
- b) Batimento cardíaco acima dos 90 bpm;
- c) Frequência respiratória acima das 20 rpm;
- d) Leucócitos acima dos 12.000/mm³ (ou mais do que 10% de leucócitos imaturos) ou leucopenia abaixo dos 4.000/mm³.

- Sépsis severa: paciente com sépsis e falha de órgãos, com pelo menos uma das seguintes:

- a) Lactato acima das 18mg/dl;
- b) SaO₂ abaixo dos 90% (ou pO₂/FiO₂ abaixo de 300);
- c) PAs (pressão arterial sistólica) abaixo de 90mmHg ou PAm (pressão arterial média) abaixo de 65mmHg;
- d) Creatinina acima de 2mg/dl ou oligúria aguda (fluxo urinário abaixo de 0,5ml/kg/h em duas horas consecutivas);
- e) INR acima de 1,5 ou APTT acima dos 60 segundos;
- f) Plaquetas abaixo das 100.000/mm³;
- g) Bilirrubina total acima das 2mg/dl
- h) Deterioração mental aguda.

- Choque séptico: hipotensão persistente apesar de adequada ressuscitação com fluídos.

Anexo III

1. Tabelas referentes aos dados gráficos

Tabela III.1 - Percentagem de neutrófilos produtores de ROS correspondentes ao ensaio Basal para os três grupos de estudo.

Grupos	Condição Basal			
	Admissão	24 h	72 h	Alta
CTR	90±17	–	–	–
AR	76±31	–	–	–
Sepsis	95±12	76±38	81±33	86±16

Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão.

Tabela III.2- Percentagem de neutrófilos produtores de ROS correspondentes ao ensaio com estimulação de fMLP para os três grupos de estudo.

Grupos	Estimulação com fMLP			
	Admissão	24 h	72 h	Alta
CTR	91±19	–	–	–
AR	79±24	–	–	–
Sepsis	93±15	77±36	85±26	83±19

Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão.

Tabela III.3 - Percentagem de neutrófilos produtores de ROS correspondentes ao ensaio com estimulação de PMA para os três grupos de estudo.

Grupos	Estimulação com PMA			
	Admissão	24 h	72 h	Alta
CTR	96±6	–	–	–
AR	93±16	–	–	–
Sepsis	99±2	98±4	99±1	98±3

Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão.

Tabela III.4- Variação da percentagem de neutrófilos produtores de ROS ao longo do tempo em doentes com sepsis para as subclasses Sobreviventes e Não sobreviventes correspondentes ao ensaio Basal.

Sepsis	Condição Basal			
	Admissão	24 h	72 h	Alta
Sobreviventes	91±15	73±38	76±37	86±16
Não-sobreviventes	100±0	100±0	99	–

Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão.

Tabela III.5 - Variação da percentagem de neutrófilos produtores de ROS ao longo do tempo em doentes com sepsis para as subclasses Sobreviventes e Não sobreviventes correspondentes ao ensaio com estimulação de fMPL.

Sepsis	Estimulação com fMPL			
	Admissão	24 h	72 h	Alta
Sobreviventes	95±11	75±34	81±30	83±19
Não-sobreviventes	84±28	98±3	96	–

Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão.

Tabela III.6 - Variação da percentagem de neutrófilos produtores de ROS ao longo do tempo em doentes com sepsis para as subclasses Sobreviventes e Não sobreviventes correspondentes ao ensaio com estimulação de PMA.

Sepsis	Estimulação com PMA			
	Admissão	24 h	72 h	Alta
Sobreviventes	99±2	98±4	99±1	98±3
Não-sobreviventes	99±2	96±6	96	–

Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão.