

SIDNÉIA SOUSA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FUNCIONAL E
FENOTÍPICO DE MONÓCITOS EM PACIENTES
SÉPTICOS**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Doutor em Ciências pelo programa de pós
Graduação em Medicina Translacional

São Paulo

2015

SIDNÉIA SOUSA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FUNCIONAL E
FENOTÍPICO DE MONÓCITOS EM PACIENTES
SÉPTICOS**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Doutor em Ciências pelo programa de pós
Graduação em Medicina Translacional

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Salomão
Co-orientadora: Dra. Milena K. C. Brunialti

São Paulo

2015

Santos, Sidnéia Sousa

Caracterização do perfil funcional e fenotípico de monócitos em pacientes sépticos / Sidnéia Sousa Santos. - São Paulo, 2015.
xvi, 97f.

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

Título em inglês: Characterization of the profile functional and phenotypic of monocytes in septic patients.

1. Sepsis. 2. Espécies de oxigênio reativas. 3. Óxido nítrico. 4. Interleucina-6. 5. Citocinas. 6. Citometria de fluxo.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DISCIPLINA DE MEDICINA TRANSLACIONAL

Chefe do Departamento: Prof. Dra. Maria Tereza Zanella

Chefe da Disciplina: Prof. Dr. Celso Francisco Hernandez Granato

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dra. Dulce Helena Casarini

Este trabalho foi realizado com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo 2011/ 20401-4 e bolsa da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SIDNÉIA SOUSA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FUNCIONAL E
FENOTÍPICO DE MONÓCITOS EM PACIENTES
SÉPTICOS**

Presidente da banca:
Prof. Dr. Reinaldo Salomão

BANCA EXAMINADORA

Tiulares:
Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha
Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara
Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano
Prof. Dra. Maria Aparecida Dalboni

Suplentes:
Prof. Dra. Beatriz Tavares Costa Carvalho
Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula

Dedicatória

*À Deus por tornar todas as coisas possíveis,
a meus pais pelo exemplo de humildade e perseverança, a meu amado João
por seu amor, compreensão e paciência, a minha família pelo apoio e a meus
amigos pelo carinho*

Agradecimentos

À Deus pela interminável força,

À Universidade Federal de São Paulo pelos conhecimentos adquiridos,

Ao professor Dr. Reinaldo Salomão pela orientação, confiança e amizade e por ser o meu exemplo de amor pela pesquisa e por me proporcionar desafios que me fizeram crescer profissionalmente.

À Dra. Milena Buniatti a quem sou eternamente grata não só pela amizade e carinho dedicados, mas por toda troca de conhecimentos que me proporcionou, de forma a me fazer crescer pessoal e profissionalmente.

Ao meu amado João por fazer parte da minha vida, por seu apoio, incentivo, companheirismo, compreensão e paciência.

À minha querida "filhinha" Amandinha não só por toda ajuda nos experimentos mas pela amizade sincera e pelo carinho que me dedicou me considerando sua mãezinha.

À minhas queridas Kamilla Fischer, Nadijane Valéria e Alejandra Nucci pelos momentos de companheirismo, descontração e muitas risadas.

À querida Antônia Alves da Cunha pela amizade de todos estes anos.

Ao meu colega Narendra Sharma pela ajuda com o paper e a tese.

Aos meus novos coleguinhas Felipe e Luana que já gosto tanto.

Aos todos meus colegas do Laboratório de Imunologia que fizeram parte desses anos, aos que aqui ainda se encontram e aos que já trilharam novos caminhos.

Aos colegas do andar Marquinhos, Marie, Ana, Juan, Regiane, Amanda, Flarice pelos momentos de descontração na hora do café.

À toda minha família pelos sólidos ensinamentos, sincero apóio e incentivo sempre.

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

Que Deus abençoe a todos!

*Deus é o nosso refúgio e fortaleza, socorro
bem presente na angústia...*
Salmos 46:01

Sumário

Listas.....	xii
Resumo.....	xv
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	8
3. Material e Métodos.....	9
3.1. Reagentes.....	9
3.2. Casuística.....	11
3.2.1. Aspectos éticos e tamanho de amostra.....	11
3.2.2. Critérios de Inclusão.....	11
3.2.3. Critérios de exclusão.....	12
3.3. Cultivo de bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	12
3.4. Estimulação <i>in vitro</i> de sangue total para estudo da produção de espécies reativas de oxigênio em monócitos.....	13
3.5. Estimulação <i>in vitro</i> de sangue total para estudo da produção de óxido nítrico (NO) em monócitos.....	14
3.6. Estimulação <i>in vitro</i> de sangue total para detecção da produção de citocinas intracelular.....	16
3.7. Aquisição e análise de dados para detecção da produção de Óxido Nítrico (NO), Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e produção de citocinas intracelular.....	17
3.8. Aquisição de dados para detecção da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), Óxido Nítrico (NO), produção de citocinas intracelular e fagocitose.....	18
3.8.1. EROs e NO.....	18
3.8.2. Citocinas intracelular.....	19
3.8.3. Fagocitose.....	20
3.9. Análise de dados da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), Óxido Nítrico (NO), citocinas intracelular e fagocitose.....	21
3.9.1. EROs e NO.....	21
3.9.2. Citocinas.....	23
3.9.3. Fagocitose.....	25
3.10. Imunofluorescência para observação da co-localização da gp91phox e p47phox.....	26
3.11. Análises estatísticas.....	27
4. Resultados.....	28
4.1. Perfil geral da Coorte.....	28
4.2. Comparação entre indivíduos saudáveis e pacientes sépticos.....	29
4.2.1. Análise da fagocitose por monócitos do sangue periférico de pacientes na coleta do D0 em relação aos indivíduos saudáveis.....	28
4.2.2. Análise da produção de EROs, NO, IL-6, TNF- α e IL-10 por monócitos do sangue periférico de pacientes na coleta do D0 em relação aos indivíduos saudáveis.....	33
4.3. Comparação entre indivíduos saudáveis, pacientes em sepse grave e choque séptico.....	31
4.3.1. Análise da fagocitose por monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis, pacientes em sepse grave e choque séptico na coleta do D0.....	31
4.3.2. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos do	

sangue periférico de indivíduos saudáveis, pacientes em sepse grave e choque séptico na coleta do D0.....	31
4.3.3. Análise da produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis, pacientes em sepse grave e choque séptico na coleta do D0.....	33
4.3.4. Análise da porcentagem de monócitos produtores de IL-6 do sangue periférico de indivíduos saudáveis, pacientes em sepse grave e choque séptico na coleta do D0.....	34
4.3.5. Análise da porcentagem de monócitos produtores de TNF- α do sangue periférico de indivíduos saudáveis, pacientes em sepse grave e choque séptico na coleta do D0.....	35
4.4. Correlação entre SOFA e espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, IL-6 e TNF- α em monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos na coleta do D0.....	36
4.5. Análise da interação da produção de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, IL-6 e TNF- α em monócitos CD163+ e CD163- do sangue periférico de pacientes na coleta do D0 em relação aos indivíduos saudáveis.....	38
4.6. Avaliações durante o seguimento dos pacientes em sepse nas amostras D0 e D7.....	40
4.6.1. Análise da fagocitose por monócitos do sangue periférico de pacientes nas coletas D0 e D7.....	40
4.6.2. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos do sangue periférico de pacientes nas coletas D0 e D7.....	41
4.6.3. Análise da produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de pacientes nas coletas D0 e D7.....	42
4.6.4. Análise da porcentagem de monócitos produtores de IL-6 do sangue periférico de pacientes nas coletas D0 e D7.....	43
4.6.5. Análise da porcentagem de monócitos produtores de TNF- α em sangue periférico de pacientes nas coletas D0 e D7.....	44
4.7. Imunofluorescência para observação da co-localização da p47phox e gp91phox.....	45
5. Discussão.....	46
6. Conclusões.....	50
7. Referências.....	51
8. Apêndice.....	55
Apêndice 1 – Aprovação do Comitê de ética em pesquisa – Hospital São Paulo.....	55
Apêndice 2 – Aprovação do Comitê de ética em pesquisa – Hospital Sírio Libanês.....	57
Apêndice 3 – Aprovação do Comitê de ética em pesquisa – Hospital Israelita Albert Einstein.....	61
9. Anexos.....	63
Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	63
Anexo 2 - Separação, contagem e congelamento de células mononucleares do sangue periférico.....	65
Anexo 3- Separação de Monócitos (Human Monocyte Enrichment Kit without CD16 depletion).....	69
Anexo 4 – Manuscrito enviado para Intensive Care Medicine Experimental (ICME).....	72

Lista de figuras

Figura 1.	Dinâmica da resposta inflamatória durante a sepse.....	06
Figura 2.	Cinética da resposta inflamatória durante a sepse.....	06
Figura 3.	Esquema representativo da reação do DCFH-DA.....	13
Figura 4.	Reação esquemática para detecção de óxido nítrico por DAF-FM diacetato.....	15
Figura 5.	Reação esquemática para detecção de citocina intracelular.....	16
Figura 6.	Estratégia de aquisição de monócitos em sangue total para detecção da produção de EROs e NO.....	19
Figura 7.	Estratégia de aquisição de monócitos em sangue total para detecção da produção de citocinas intracelular.....	20
Figura 8.	Estratégia de aquisição de monócitos em sangue total para mensuração da fagocitose.....	21
Figura 9.	Estratégia de análise para detecção da produção de EROs e NO em monócitos e subpopulações.....	22
Figura 10.	Estratégia de análise da produção de citocina intracelular em monócitos e subpopulações.....	24
Figura 11.	Estratégia de análise da mensuração de fagocitose em monócitos do sangue periférico.....	25
Figura 12.	Metabolismo oxidativo de monócitos do sangue periférico de 10 indivíduos saudáveis, 19 pacientes em sepse grave e 10 pacientes em choque séptico.....	32
Figura 13.	Produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de 10 indivíduos saudáveis, 19 pacientes em sepse grave e 10 pacientes em choque séptico.....	33
Figura 14.	Porcentagem de monócitos produtores de IL-6 do sangue periférico de 10 indivíduos saudáveis (caixas em branco), 19 pacientes em sepse grave (caixas em cinza claro) e 10 pacientes em choque séptico.....	34
Figura 15.	Porcentagem de monócitos produtores de TNF- α do sangue periférico de 10 indivíduos saudáveis (caixas em branco), 19 pacientes em sepse grave (caixas em cinza claro) e 10 pacientes em choque.....	36
Figura 16.	Correlação entre o escore SOFA e produção de EROs em monócitos de sangue total.....	37
Figura 17.	Interação da expressão de CD163 com a produção de ROS, NO, IL-6 e TNF- α em monócitos.....	39
Figura 18.	Metabolismo oxidativo de monócitos do sangue periférico de 15 pacientes sépticos nas coletas do D0 e D7.....	41
Figura 19.	Produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de 15 pacientes sépticos nas coletas do D0 e D7.....	42
Figura 20.	Porcentagem de monócitos produtores de IL-6 do sangue periférico de 15 pacientes sépticos nas coletas do D0 e D7.....	43
Figura 21.	Porcentagem de monócitos produtores de TNF- α em sangue periférico de 15 pacientes sépticos nas coletas do D0 e D7.....	44
Figura 22.	Co-localização da gp91phox e da p47phox (MIF) em PBMC de pacientes sépticos nas coletas (n=20) e D7 (n=10).....	45

Lista de tabelas

Tabela 1.	Condições utilizadas no ensaio de metabolismo oxidativo em monócitos por citometria de fluxo.....	13
Tabela 2.	Condições utilizadas no ensaio de óxido nítrico de monócitos por citometria de fluxo.....	15
Tabela 3.	Condições utilizadas no ensaio de citocina intracelular em monócitos por citometria de fluxo.....	17
Tabela 4.	Produção de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, IL-6, TNF- α e IL-10 por monócitos do sangue periférico de pacientes na coleta do D0 em relação aos indivíduos saudáveis.....	29

Lista de abreviaturas

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

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

Resumo

Introdução: O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra infecções. A erradicação de microorganismos por monócitos, depende em grande parte da capacidade fagocítica e posterior geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), assim como produção de óxido nítrico (NO) e citocinas. Sepsé é definida como uma resposta inflamatória sistêmica (SIRS) provocada por uma infecção e a natureza da resposta inflamatória ressaltando a fisiopatologia da sepsé tem sido extensivamente estudada. Compreender a natureza de como a resposta inflamatória resalta a fisiopatologia da sepsé não só ajuda a esclarecer os mecanismos da síndrome, mas também leva à identificação de novos alvos terapêuticos. **Objetivo:** Avaliar se funções de monócitos seriam reguladas diferencialmente em um paciente com septicemia através da avaliação simultânea da atividade fagocitária, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), óxido nítrico e a produção de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α). **Materiais e métodos:** Foi coletado sangue em heparina de 34 pacientes sépticos nos dias zero (D0), até 48h após o evento sepsé. Foi realizada uma segunda coleta em 15 destes pacientes sete dias (D7) depois da primeira. A produção de EROs, NO e Citocinas foi mensurada por citometria de fluxo. Para EROs e NO utilizou-se os reagentes DCFH-DA, DAF-FM-DA, respectivamente, incubados por 30 minutos em banho maria 37°C. Para citocinas utilizamos o reagente Brefeldina A incubado na estufa de CO₂ a 37°C por 4 h. IL-6 e TNF- α intracelular foram detectados utilizando anticorpos específicos conjugados com fluorocromos. Nos ensaios foi observada a produção espontânea e após os estímulos com LPS, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Funções de monócitos também foram avaliadas em subgrupos de monócitos CD163⁺ e CD163⁻. Para o ensaio de fagocitose foi utilizado bactérias *E. coli* conjugadas com fluorescência. Os dados foram adquiridos no programa FACSDiva e analisados no programa FlowJo. **Resultados:** Monócitos de pacientes sépticos apresentaram preservada fagocitose, aumento da produção de EROs e NO e diminuição da produção de citocinas inflamatórias, em comparação com os monócitos dos voluntários saudáveis. Aumento TNF- α e IL-6 e diminuição da geração de EROs e NO foi observada nas amostras do D7 em comparação com amostras D0. Em geral, monócitos CD163⁺ produziram quantidades elevadas de IL-6 e TNF- α e menores quantidades de EROs e NO do que os monócitos CD163⁻. **Conclusão:** Em conclusão, demonstramos que monócitos de pacientes sépticos, que são incapazes de produzir citocinas inflamatórias, exibem potente atividade fagocítica e aumento da geração de ROS e NO. O aumento da produção de EROs e NO e diminuição de citocinas (IL-6 e TNF- α) no início da sepsé reforçam a existência de uma reprogramação celular com consequente diminuição da inflamação ao mesmo tempo em que aumenta a produção de moléculas microbidas, como NO e EROs para manter a capacidade das células de eliminação de patógenos promovendo assim uma homeostase do organismo.

ABSTRACT

Background The nature of the inflammatory response underscoring the pathophysiology of sepsis has been extensively studied. We hypothesized that different cell functions would be differentially regulated in a patient with sepsis. Thus, we evaluated modulation of monocyte functions during sepsis by simultaneously assessing their phagocytic activity, the generation of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the production of inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α). **Methods** Whole blood was obtained from septic patients (SP) both at admission (D0, n=34) and after seven days of therapy (D7, n=15); 19 healthy volunteers (HV) were included as a control group. The cells were stimulated with LPS, *P. aeruginosa*, and *S. aureus*. The ROS and NO levels were quantified in monocytes in whole blood by measuring the oxidation of 2,7-dichlorofluorescein diacetate and 4-amino-5-methylamino-2,7-difluorofluorescein diacetate, respectively. Intracellular IL-6 and TNF- α were detected using fluorochrome-conjugated specific antibodies. Monocyte functions were also evaluated in CD163⁺ and CD163⁻ monocyte subsets. **Findings** The monocytes from SP presented with preserved phagocytosis, enhanced ROS and NO generation, and decreased production of inflammatory cytokines compared with the monocytes from HV. TNF- α and IL-6 increased and ROS generation decreased in D7 compared with D0 samples. In general, CD163⁺ monocytes produced higher amounts of IL-6 and TNF- α and lower amounts of ROS and NO than did CD163⁻ monocytes. **Interpretation** In conclusion, we demonstrated that monocytes from septic patients, which are unable to produce inflammatory cytokines, display potent phagocytic activity and increased ROS and NO generation.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Sepse foi definida como uma resposta inflamatória sistêmica (SIRS) provocada por uma infecção. Esta complexa síndrome que é a causa mais frequente de morte em pacientes hospitalizados representa um grande desafio para ciência (Bone *et al.*, 1992; Levy *et al.*, 2003; Deutschman e Tracey, 2014).

Nos Estados Unidos (EUA) ocorreram 215.000 mortes por sepse em 1995, este valor representou 9,3% de todas as mortes no país e foi equivalente à quantidade de óbitos após infarto agudo do miocárdio (Angus *et al.*, 2001). No ano 2000, também nos EUA estimou-se que a incidência de sepse era de 240,4 episódios por 100.000 habitantes (Martin *et al.*, 2003). Um estudo multicêntrico brasileiro, conduzido entre os anos de 2001 e 2002, mostrou que a mortalidade por sepse, sepse grave e choque séptico aumentou progressivamente de 34,7%, para 47,3% e 52,2%, respectivamente, conforme o avançar do processo fisiopatológico (Silva *et al.*, 2004). Um trabalho realizado no Brasil que avaliou as mortes ocorridas entre 2002 e 2010 demonstrou que a mortalidade aumentou de 65,9 mortes /100.000 habitantes para 97,8 mortes/100.000hab neste período (Taniguchi *et al.*, 2014). Recentemente, um estudo epidemiológico nacional realizado pelo Instituto Latino americano de Sepse em 229 Unidades de Terapia Intensiva no ano de 2014 mostrou uma prevalência de 29,6% e mortalidade global de 55% no Brasil (ILAS).

No início da década de 90 o consenso das Sociedades de Terapia Intensiva e de Pneumologistas (*American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care*), definiu sepse como uma resposta sistêmica à infecção manifestada pela presença de duas ou mais dessas manifestações: alteração de temperatura, acima de 38°C ou abaixo de 36°C; b) aumento de frequência cardíaca, acima de 90 batimentos por minuto; c) aumento de frequência respiratória, acima de 20 respirações por minuto ou PaCO₂ menor que 32 mmHg; d) contagem de leucócitos no sangue acima de 12000/mm³ ou menor que 4000/mm³ ou mais do que 10% de neutrófilos imaturos (Bone *et al.*, 1992; Remick, 2007). As formas mais graves da síndrome são caracterizadas por disfunção orgânica aguda e choque séptico, que estão associados com o aumento da morbidade (Rangel-Frausto *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 2004; Angus e Van Der Poll, 2013).

Este conceito de sepse vem se tornando impreciso ao longo dos anos e recentemente, diversos estudos chamam a atenção para o fato que os pacientes com sepse ou choque séptico podem desenvolver doença crítica persistente (*persistent*

critical illness) com disfunção orgânica evidente que dura semanas ou meses. Este conceito recente surgiu para designar pacientes que anteriormente morreriam, mas que nos dias atuais permanecem vivos devido ao grande suporte exógeno que recebem para manter as funções dos órgãos (Gentile *et al.*, 2012; Deutschman e Tracey, 2014; Vanzant *et al.*, 2014).

Compreender a natureza de como a resposta inflamatória contribui para a fisiopatologia da sepse não só ajuda a esclarecer os mecanismos da síndrome, mas também leva à identificação de novos alvos terapêuticos.

As infecções bacterianas são a causa mais comum de sepse. Neste contexto monócitos e neutrófilos respondem a essa invasão produzindo grandes quantidades de citocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que contribuem para erradicação do patógeno. Paradoxalmente, muitas das alterações fisiopatológicas observadas na sepse são desencadeadas pela ativação da resposta inflamatória, pois a produção excessiva desses mediadores pode levar a disfunção e falência de órgãos. Estímulos como LPS e TNF- α podem ativar fatores de transcrição como NF- κ B resultando em ativação da transcrição de múltiplos genes. Isso conduz a liberação de citocinas, aumento de moléculas de adesão e quimiocinas. A produção de EROs e NO pode ser relatadas como alguns dos efeitos danosos da produção de citocinas durante a sepse (Benjamim *et al.*, 2002; Cepinskas e Wilson, 2008; Salomao *et al.*, 2012).

O sucesso no processo de recuperação do paciente com sepse depende da sintonia entre as respostas pró e anti-inflamatória. O conceito inicial da "tempestade de citocinas" têm se mostrado impreciso ao longo dos estudos, e a resposta anti-inflamatória compensatória (CARS) foi incorporada a este conceito, como sendo importante para explicar a trajetória dos pacientes em unidade de terapia intensiva. O balanço dessas respostas - SIRS e CARS –como sendo a causa da inflamação ou imunossupressão em pacientes séptico (Bone, 1996).

Tem sido proposto que a resposta inflamatória inicial é seguida por um estado de hipo-reatividade ou paralisia imune em pacientes com sepse protraída (Hotchkiss e Karl, 2003; Riedemann *et al.*, 2003). Atualmente, é geralmente aceito que a infecção provoca ambas as respostas inflamatórias e anti-inflamatórias. Por conseguinte, dois mecanismos principais têm sido propostos para as injúrias causados por septicemia: sustentada ativação da imunidade inata levando a inflamação e injúria (Xiao *et al.*, 2011) e uma fase inicial hiperinflamatória predominante seguida de imunidade diminuída e um estado anti-inflamatório (Hotchkiss *et al.*, 2013a).

Um problema com este modelo é que as células imunes inatas seriam reguladas em suas funções globais, e monócitos e neutrófilos, por exemplo, estariam com todas as suas atividades suprimidas em paciente com sepse protraída (Hotchkiss *et al.*, 2013b). Na verdade, a maioria dos estudos que avaliaram células do sangue de pacientes sépticos demonstraram uma falha na produção de citocinas inflamatórias após estimulação *in vitro* (Hotchkiss e Karl, 2003; Riedemann *et al.*, 2003; Hotchkiss *et al.*, 2013a), enquanto que os neutrófilos demonstram funções reguladas tanto para cima quanto para baixo (Brown *et al.*, 2006). Em conformidade, nós e outros autores observamos uma regulação positiva da geração de espécies reativas de oxigênio e fagocitose em neutrófilos humanos durante sepse grave e shock séptico (Brown *et al.*, 2006). Estudo de nosso grupo demonstrou o aumento de metabolismo oxidativo em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de pacientes com sepse comparado a voluntários sadios na condição basal e frente a diversos estímulos. Também foi observado que pacientes com sepse grave e choque séptico com SOFA ≥ 7 (SOFA de discriminação entre sobreviventes e não sobreviventes/mortalidade 28 dias) apresentaram maior produção de metabolismo oxidativo. Houve forte correlação entre produção de EROs em monócitos e neutrófilos destes pacientes. Este estudo demonstrou a importância da produção de EROs nos altos índices de mortalidade de pacientes com sepse (Martins *et al.*, 2008).

Esses resultados foram confirmados em outra coorte de pacientes sépticos e foram estendidos para a geração de óxido nítrico (Santos *et al.*, 2012), que também tem sido relatada como fator associado à mortalidade na sepse, pois os mediadores de óxido nítrico sintase (NOS) conduzem à hipóxia grave nos órgãos periféricos, resultando em falência progressiva de órgãos. A NOS também pode contribuir diretamente para o dano no tecido de órgãos por seu efeito citotóxico direto mediado pelo peroxinitrito (Szabo, 2006).

A detecção de NO em amostras biológicas representa um desafio, em função da ínfima concentração e da meia-vida extremamente curta deste composto. Sendo assim a maioria dos estudos utiliza-se da produção dos seus metabólitos como nitrito e nitrato, detecção ou inibição das NO sintases para estimarem sua produção e efeitos. Entretanto, o valor de estratégias terapêuticas como bloqueio das NO sintases e administração de doadores de óxido nítrico é ainda controverso (Baumgart *et al.*, 2009). A administração de aminoguanidina, um inibidor de NO sintase preveniu a falência de migração dos neutrófilos e protegeu camundongos submetidos à CLP (modelo de ligação cecal e

perfuração), enquanto camundongos deficientes de NO sintase não apresentaram falência de migração, mas evoluíram com 100% de letalidade e altas concentrações de bactérias no exudato peritoneal. Demonstrou-se assim, que os neutrófilos destes camundongos preservavam sua capacidade de migração, mas não tinham atividade microbicida pela falta de produção de NO (Benjamim *et al.*, 2002). Em estudo de fase III, randomizado, multicêntrico, duplo-cego, placebo controlado, que estudou pacientes com choque séptico tratados com antagonista competitivo de óxido nítrico Nw-monomethyl-L-arginine (L-NMMA), ou seja, inibição não seletiva de NOS, embora produzissem efeitos positivos na pressão sanguínea e resistência vascular, estava relacionada com aumento da mortalidade (Lopez *et al.*, 2004).

As observações de associação de produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico com desfecho clínico, observadas na literatura baseavam-se em estudo de corte e não de seguimento de um mesmo indivíduo em diferentes estádios da sepse. Além disso, ainda não havia sido relatada a mensuração de óxido nítrico de forma direta nas células produtoras durante o evento da sepse. Para corroborar esses dados, avaliamos a produção de EROs e NO logo após as primeiras manifestações clínicas da sepse e após 7 dias de tratamento e comparamos os resultados encontrados quanto à produção de NO e EROs com desfecho clínico. A produção de EROs e NO se mostrou aumentada em pacientes sépticos comparado a indivíduos saudáveis e esta produção se mostrava diminuída após 7 dias de tratamento em indivíduos que sobreviveram à alta hospitalar (Santos *et al.*, 2012).

A produção de citocinas desempenha um papel crucial na sepse, uma vez liberadas elas levam a uma consequente ativação da resposta imune, sendo assim, entender o perfil de citocinas em pacientes com sepse pode ser útil para avaliar a gravidade da doença e prever mortalidade para um melhor acompanhamento do paciente (Chaudhry *et al.*, 2013).

Estudos do nosso grupo relatam uma menor produção de citocinas *in vitro* após estímulo de células do sangue periférico de pacientes com sepse comparado a indivíduos saudáveis. Foi observada diminuição de TNF- α e IFN- γ no sangue total de pacientes com sepse ou pacientes com doença de base sem sepse comparados a indivíduos saudáveis (Rigato e Salomao, 2003). Uma regulação negativa da produção de citocinas inflamatórias também foi observada em monócitos de pacientes com sepse grave e choque séptico em relação à sepse e a indivíduos saudáveis (Brunialti *et al.*, 2006).

Sendo assim nossos estudos demonstram que as células mononucleares periféricas (PBMC) (Rigato e Salomao, 2003; Brunialti *et al.*, 2006) e monócitos (Salomao *et al.*, 2002) de pacientes sépticos, que eram incapazes de produzir citocinas inflamatórias em nossos estudos anteriores, mostraram uma regulação positiva da geração de ROS (Martins *et al.*, 2008), que foi confirmada em outro grupo de pacientes no qual também foi observada a regulação positiva da geração de NO (Santos *et al.*, 2012). Estes resultados indicam que ambas hiper e hiporresposta podem ocorrer, dependendo das células e funções avaliadas e o que pode ser ainda mais expressivo em um processo crítico persistente (Xiao *et al.*, 2011). Isto indica uma modulação da função das células que interrompe a amplificação da resposta imunitária, mantendo o controle sobre a infecção (Salomao *et al.*, 2012).

Em resposta a patógenos e sinais intracelulares os macrófagos passam por profundas mudanças fenotípicas que os ajudam na adaptação para uma resposta eficaz contra os microorganismos. Essas mudanças fenotípicas são cruciais para o entendimento da versatilidade dessas células (Biswas *et al.*, 2012).

A reprogramação de funções de monócitos foi proposta pela primeira vez em um modelo de tolerância ao LPS, onde, dependendo do tratamento de pré-condicionamento, LPS induzia efeitos *priming* seletivos sobre a produção de TNF- α e NO em macrófagos peritoneais de ratos (Zhang e Morrison, 1993). Estudos posteriores demonstraram que células tolerantes ao LPS não produzem citocinas inflamatórias, mas apresentam uma potente atividade fagocítica e retém a capacidade de gerar ROS (Biswas e Lopez-Collazo, 2009; Del Fresno *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2010; Salomao *et al.*, 2012).

Um aspecto importante da biologia dos macrófagos é o seu papel na atividade de reparação. Estudos têm demonstrado uma forma alternativa de ativação ao estudar os efeitos de IL-4 (e IL-13) nos macrófagos. Os macrófagos alternativamente ativados (AAM) exibem atividade de regulação ou de reparação e níveis reduzidos de citocinas inflamatórias (Stein *et al.*, 1992; Mosser e Edwards, 2008). Estas células apresentaram um aumento da expressão de receptores CD206 (receptor de manose) e CD163 (receptor do complexo hemoglobina-haptoglobina), (Stein *et al.*, 1992; Mantovani *et al.*, 2004). Uma expressão aumentada de CD206, CD163 e CD163 solúvel foi demonstrada em pacientes sépticos comparados a indivíduos saudáveis (Moller *et al.*, 2006; Brunialti *et al.*, 2012).

Alguns autores caracterizam a sepse como um estado de imunoparalisia caracterizado por debilitada resposta imune inata e adaptativa podendo ter um papel

central na patogênese de danos teciduais, falência de múltiplos órgãos e morte (Riedemann *et al.*, 2003; Hotchkiss *et al.*, 2013a; Schulte *et al.*, 2013) (Figura 1).

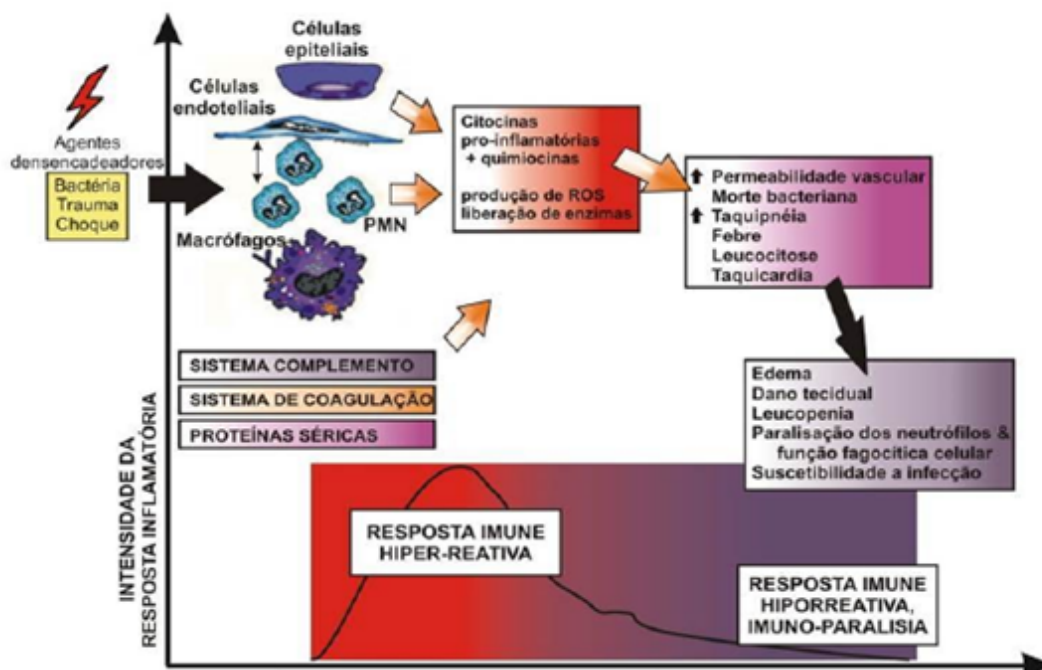


Figura 1: Dinâmica da resposta inflamatória durante a sepse. Riedemann, 2003

Como demonstrado na figura 2 os nossos achados indicam, no entanto que monócitos de pacientes sépticos apresentam uma diminuição da produção de citocinas inflamatórias e alta capacidade de gerar EROs e NO apoiando ainda mais a idéia de que a função dessas células é reprogramada nestes pacientes (Brunialti *et al.*, 2006; Salomao *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2012).

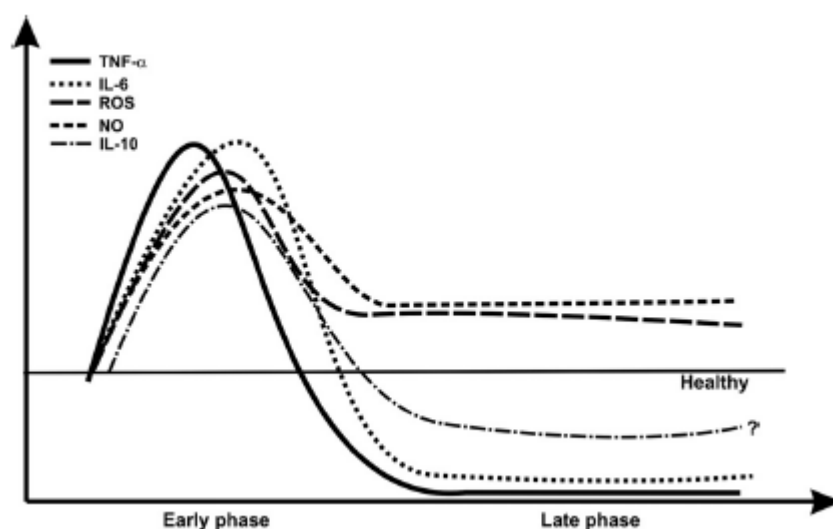


Figura 2: Cinética da resposta inflamatória durante a sepse. Salomão, 2012.

Esta dicotomia entre a inibição da produção de citocinas inflamatórias e de manutenção da geração de EROs foi observada em septicemia experimental e em monócitos tolerantes ao LPS obtidos de voluntários saudáveis. Outros estudos também demonstraram que peptídeos antimicrobianos inibem a produção de TNF- α e NO induzido por LPS em macrófagos humanos e murinos e aumentam a explosão respiratória (Zughaier *et al.*, 2005). Não está claro até que ponto este fenótipo pode ser devido à diferenciação de monócitos em células alternativamente ativados, mas encontramos aumento da expressão de CD163 e CD206, que são marcadores de macrófagos ativados alternativamente, em monócitos de pacientes sépticos (Brunialti *et al.*, 2012).

Diversos estudos chamam a atenção para o fato de que muitas das mudanças que ocorrem durante a tolerância ao LPS ocorrem também em macrófagos com uma polarização M2 (Biswas e Lopez-Collazo, 2009; Pena *et al.*, 2011). Estudo realizado em macrófagos de camundongos submetidos a um estado de tolerância ao LPS demonstrou que genes tolerizados eram, em grande parte, genes que codificam mediadores inflamatórios enquanto os genes não tolerizados eram em sua maioria genes que se ligam a patógenos com função antimicrobiana (Foster *et al.*, 2007), sugerindo um estado de reprogramação muito semelhante ao encontrado funcionalmente em nossos estudos (Martins *et al.*, 2003; Brunialti *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2012). Isto nos leva a crer que a resposta do hospedeiro não é um simples modelo com fase pró-inflamatória inicial seguida de uma resposta anti-inflamatória, ou que as células sucumbiriam a um estado persistente de imunossupressão, mas que ao contrario disso, existam regulações minuciosas e específicas que levariam as células a determinadas reprogramações. Essas reprogramações ocorreriam para combater os patógenos e ao mesmo tempo preservar a célula mantendo a homeostase e levando a uma recuperação da resposta imunológica nos pacientes que se recuperam da sepse (Salomao *et al.*, 2012).

No presente estudo testamos a hipótese de que diferentes funções celulares seriam reguladas diferenciadamente em um paciente com sepse. Assim, avaliamos os monócitos de pacientes sépticos quanto a atividade fagocitária, a geração de EROs e NO e a produção de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α). Devido o número de monócitos ser variável durante o curso da infecção, estes parâmetros foram avaliados ao nível celular por citometria de fluxo. Além disso, essas atividades foram avaliadas nos subgrupos de células com ou sem expressão CD163.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar fenotípica e funcionalmente os monócitos obtidos de pacientes sépticos, caracterizando o padrão de modulação e sua associação com apresentação clínica e desfecho.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar se a modulação da produção de citocinas (**TNF- α** , **IL-6** e **IL-10**), geração de **óxido nítrico**, **espécies reativas de oxigênio** e **fagocitose** ocorre de forma diferenciada em monócitos de pacientes sépticos, avaliando-se essas funções em nível intracelular.
- Verificar se as modulações funcionais dos monócitos nas vias acima mencionadas correlacionam-se com a expressão de CD163 marcador de monócitos alternativamente ativados.
- Investigar se a produção de EROs se dá pela ativação das **subunidades da NADPH-oxidase**.

Materiais e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes

- PBS 0,15M pH 7,2 [8g NaCl (Labsynth, Diadema, SP, Brasil); 0,2g KH_2PO_4 (CAQ, Diadema, SP, Brasil); 1,15g Na_2HPO_4 (CAQ); 0,2g KCl (Labsynth) diluído em 1 litro de água destilada].
- Solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 3mM [0,111g EDTA (Labsynth), diluído em 100mL de PBS].
- Solução de NaCl 0,2% (1g de NaCl diluído em 500mL de água destilada).
- Solução de NaCl 1,6% (8g de NaCl diluído em 500mL de água destilada).
- Dimetilssulfóxido (DMSO, Calbiochem, Gibbstown, NJ, EUA).
- Brefeldina A (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) (solução estoque: 5mg/mL diluída em DMSO) Solução de uso diluída em PBS estéril 1mg/mL. Concentração final na cultura celular: 10 μ g/mL.
- Solução de Lise 10x concentrada BD (BD Bioscience, San Jose, Califórnia, EUA).
- Tampão de fixação [PBS 1% paraformaldeído, pH 7,4-7,6 (Polysciences Inc., Warrington, PA, EUA)].
- Tampão de permeabilização [100mL de PBS, 1mL de soro fetal bovino (Invitrogen Corporation Ltda, Carlsbad, Califórnia, EUA); 0,1g de saponina (Sigma, Saint Louis, MO, EUA)].
- Meio de cultura RPMI 1640 pH=7,0 suplementado com penicilina/estreptomicina 10 UI/mL, L-glutamina 200mM, HEPES 1%, piruvato de sódio 100mM, 2-mercaptoetanol 1000x (Invitrogen Corporation).
- Tampão MACS [0,500g de albumina sérica bovina (BSA, Sigma) 0,372g de EDTA (Labsynth), 500 mL de PBS].
- 2'7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH, Sigma), na concentração 0,3 mM diluído em PBS.
- 4-amino-5-metilamino- 2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM DA, Invitrogen Ltda, Carlsbad, Califórnia, EUA), na concentração 5 mM diluído em PBS.
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853, Oxoid Ltda, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra).
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, Oxoid).
- Solução salina 0,8% [8g de NaCl (Labsynth) diluído em 1000mL de água destilada].
- Meio Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco– PROLAB Ltda, São Paulo, Brasil).
- Meio Mueller Hinton agar (MHA) (Difco).

- Anticorpo anti-CD14 conjugado a proteína peridina clorofila (PerCP), clone MΦP9 (BD Bioscience, San Jose, Califórnia, EUA).
- Anticorpo anti-Interleucina-6 (IL-6) conjugado a alofocianina (APC) clone MQ2-13A5 (BD Bioscience).
- Anticorpo anti-Interleucina-10 (IL-10) conjugado a eFluor 450 clone JES3-9D7 (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA).
- Anticorpo anti-fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) conjugado a ficoeritrina conjugada a cianina 7 (PeCy7), clone Mab11 (BD Bioscience).
- Anticorpo anti-CD163 (CD163) conjugado a ficoeritrina (PE), clone GHI/61 (BD Bioscience);
- Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden).
- Lâminas de vidro (Labor Import, Osasco, São Paulo, Brasil).
- 6- (Iodoacetamido) fluorescein (Sigma).
- Anti- gp91phox (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas EUA).
- Anti-p47phox (Merck Milipore, Billerica, Massachusetts, EUA).
- Anti- iNOS (Santa Cruz Biotechnology).
- Rippa *buffer* (Sigma).
- Lamínulas (Labor Import).
- Fluoromount Aqueous Mounting Medium (Sigma).
- Phagotest (Glycotop Biotechnology, Heidelberg, Alemanha).
- EasySep - Human Monocyte Enrichment Kit without CD16 depletion, Catálogo: #19058 (STEMCELL Technologies Inc. Vancouver, Canadá).

3.2. Casuística

3.2.1. Aspectos éticos e tamanho de amostra:

Voluntários sadios e pacientes sépticos foram incluídos no estudo após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, (Anexo 1) por ele mesmo ou por seu responsável legal. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP, CEP 29677 de 7/6/2013 e dos Hospitais Sírio Libanês e Israelita Albert Einstein (Apendices 1-3).

Foram coletados 10mL de sangue em tubo à vácuo contendo heparina de sódio (BD Bioscience) de 34 pacientes sépticos e 19 voluntários sadios. Dos 34 pacientes 15 foram seguidos para obtenção de amostra após 7dias, óbito ou alta hospitalar. As amostras foram processadas em até quatro horas após a coleta no Laboratório de Imunologia da Disciplina de Infectologia da UNIFESP/EPM.

3.2.2. Critérios de Inclusão:

Os indivíduos foram incluídos neste estudo entre Maio de 2014 à Junho 2015.

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

Pacientes: Foram incluídos prospectivamente pacientes com quadro clínico e laboratorial de sepse grave ou choque séptico, classificados de acordo com as definições adaptadas do consenso de 1992 (Bone *et al.*, 1992) admitidos no Hospital São Paulo, Hospital Sírio Libanês ou Hospital Israelita Albert Einstein, na cidade de São Paulo. Os pacientes foram incluídos nas primeiras 48 horas do evento definidor de sepse grave ou choque séptico.

3.2.3. Critérios de exclusão:

1. Pacientes menores de 18 anos ou doenças com comprometimento imune, como neoplasias ou Aids.
2. Pacientes que estivessem participando de alguma terapia experimental.
3. O evento definidor de sepse grave ou choque ocorrido há mais de 48 horas.
4. Pacientes moribundos ou com morte iminente.

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

As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* foram cultivadas em 300mL de meio Trypticase Soy Broth (TSB) a 37°C, sob agitação, até atingir a fase exponencial de crescimento. Após o cultivo, os frascos contendo as culturas foram colocados em banho-maria a 60°C por 30 minutos, para causar a morte das bactérias. Uma alíquota de cada cultura foi semeada em meio Müeller Hinton Agar (MHA) e incubada a 37°C por 48 horas, para certificação da morte das bactérias. As suspensões bacterianas foram então centrifugadas por 10 minutos a 3.800g e o sobrenadante foi desprezado. Foram realizadas 3 lavagens com solução salina 0,85%, seguidas de centrifugação por 10 minutos a 3.800g. Após as lavagens, as bactérias foram suspendidas em solução salina 0,85% até atingir a turbidez equivalente ao tubo número 8 da escala de McFarland (24×10^8 células/mL). Alíquotas da suspensão de bactérias foram estocadas a -20°C.

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

A melhor dose definida para mensuração de EROs foi 200µL de *S. aureus* (48×10^7) e 10µL de *P. aeruginosa* ($2,4 \times 10^7$). Para mensuração de NO a melhor dose definida foi 12µL de *S. aureus* ($2,88 \times 10^7$) e 12µL de *P. aeruginosa* ($2,88 \times 10^7$) e para a detecção intracelular de citocinas a melhor dose definida foi 37,5µL de *S. aureus* ($10,5 \times 10^7$) e 37,5µL de *P. aeruginosa* ($10,5 \times 10^7$).

3.4. Estimulação in vitro de sangue total para estudo da produção de espécies reativas de oxigênio em monócitos.

Para a mensuração do metabolismo oxidativo, foi avaliada a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) utilizando-se 200µL do reagente 2'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) a 0,3mM. O DCFH-DA tem a propriedade de penetrar rapidamente nas células por meio de difusão. Uma vez no espaço intracelular é hidrolisado por esterases transformando-se em 2'-diclorofluoresceína (DCFH) que é um composto não fluorescente e impermeável à membrana celular. Este, por sua vez, reage com as EROs, em particular com o peróxido de hidrogênio, sofrendo oxidação, resultando em compostos altamente fluorescentes, diclorofluoresceína (DCF), cuja a excitação de fluorescência e a emissão máxima captadas pelo citômetro de fluxo são 496 e 520nm, respectivamente (Figura 3).

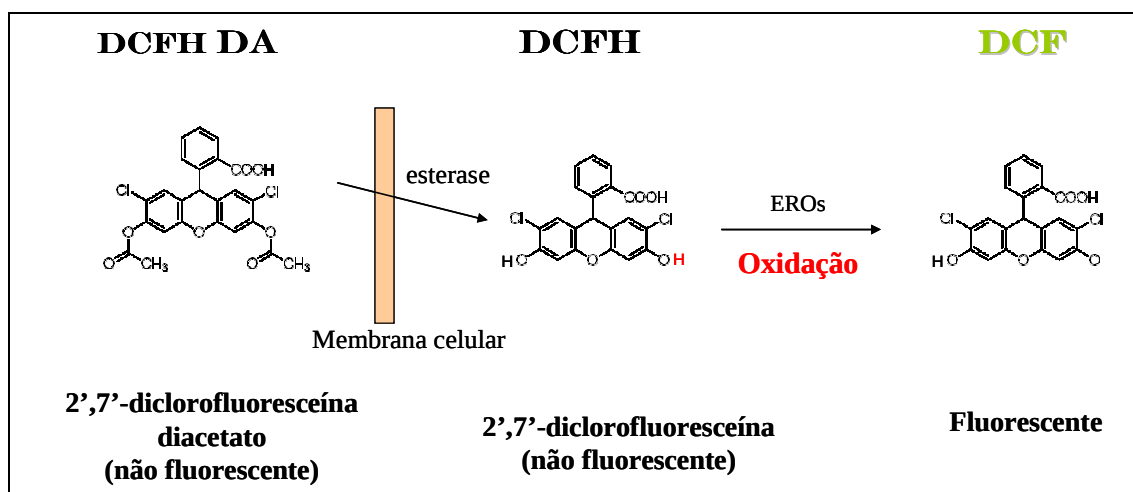


Figura 3: Esquema representativo da reação do DCFH-DA.

Nos ensaios foi observada a produção espontânea de espécies reativas de oxigênio, bem como a produção após os estímulos com LPS (100ng/mL), *S. aureus* e *P. aeruginosa* (24×10^8 células/mL), bactérias gram-positivas e gram-negativas, respectivamente (tabela 1). Demais condições estão na tabela 1.

Tabela 1: Condições utilizadas no ensaio de metabolismo oxidativo em monócitos por citometria de fluxo.

	Incubação			Marcação Superfície		
	Sangue	PBS	Estímulo	DCFH	CD14-PerCP	CD163-PE
Controle	100µL	700µL		200µL	6µL	15µL
LPS	100µL	690µL	10µL	200µL	6µL	15µL
<i>P. aeruginosa</i>	100µL	690µL	10µL	200µL	6µL	15µL
<i>S. aureus</i>	100µL	500µL	200µL	200µL	6µL	15µL
DCFH	100µL	500µL				
Branco	100µL	900µL				
Isotipo	100µL	700µL		200µL	6µL	15µL_iso

Os tubos foram incubados por 30 minutos em banho-maria a 37°C agitando-os de 10 em 10 minutos. Foram adicionados 2mL de solução EDTA 3mM para bloquear a reação, seguido de centrifugação por 5 minutos a 800g. As hemácias foram lisadas com adição de 2mL de NaCl 0,2% por 20 segundos, seguido de adição de 2mL de NaCl 1,6% por 20 segundos. Após centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e adicionados 2mL de PBS. Os botões celulares foram incubados com 6µL de CD14-PerCP por 15 minutos no escuro. Os tubos receberam 2mL de PBS. Após nova centrifugação o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 250µL de EDTA 3mM para leitura em citômetro de fluxo e posterior análise.

3.5. Estimulação in vitro de sangue total para estudo da produção de óxido nítrico (NO) em monócitos.

Para mensuração da produção de NO foi utilizado 4-amino-5-metilamino- 2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM DA). Este composto atravessa passivamente as membranas celulares. Uma vez no interior das células, ele é deacetilado pelas esterases intracelulares, que o transformam em DAF-FM. Na presença de NO, a fluorescência do DAF-FM aumenta formando o derivado benzotriazólico, cujo espectro de excitação e emissão máxima de fluorescência são 495 e 515nm, respectivamente (Kojima *et al.*, 1998) (figura 4).

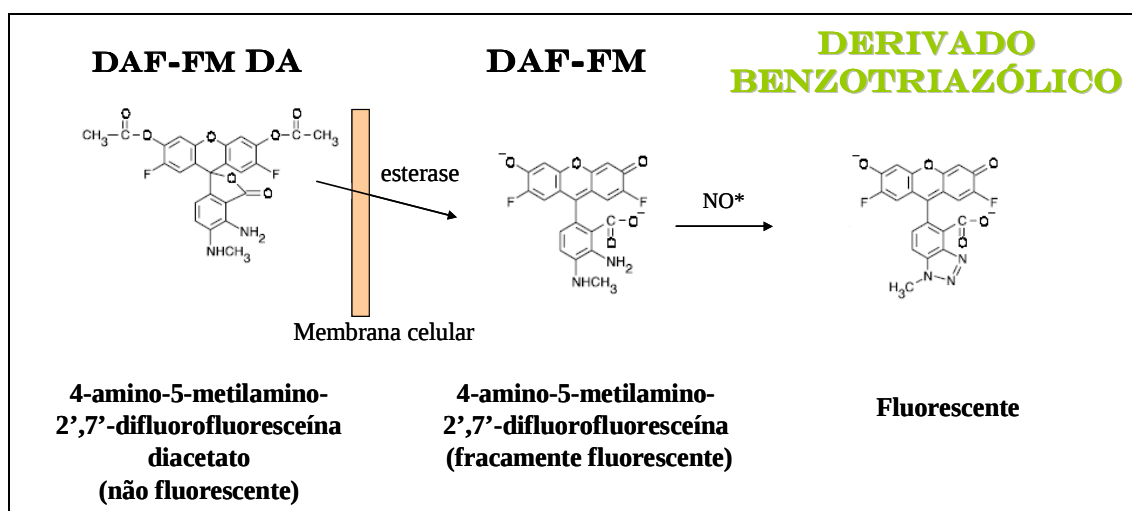


Figura 4: Reação esquemática para detecção de óxido nítrico por DAF-FM diacetato.

Oitenta microlitros de sangue heparinizado foram distribuídos em tubos de poliestireno de 5mL e posteriormente foram estimulados com LPS (100ng/mL), *S. aureus* e *P. aeruginosa* (24×10^8 células/mL), bactérias gram-positivas e gram-negativas, respectivamente. Foram acrescentados 24μL de DAF-FM DA 0,05mM por tubo e os volumes acertados com PBS para 120μL (tabela 2). Demais condições estão na tabela 2.

Tabela 2: Condições utilizadas no ensaio de óxido nítrico de monócitos por citometria de fluxo.

	Incubação			Marcação Superfície		
	Sangue	PBS	Estímulo	DCFH	CD14-PerCP	CD163-PE
Controle	80μL	16μL		24μL	6μL	15μL
LPS	80μL	15,2μL	0,8μL	24μL	6μL	15μL
<i>P. aeruginosa</i>	80μL	4μL	12μL	24μL	6μL	15μL
<i>S. aureus</i>	80μL	4μL	12μL	24μL	6μL	15μL
DAF+Bac	80μL	4μL	12μL	24μL		
Branco	80μL	40μL				
Isotipo	80μL	40μL		24μL	6μL	15μL_iso

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

sobrenadantes, as amostras foram suspensas adicionando-se 0,25mL de PBS por tubo e foram mantidos em geladeira até a leitura em citômetro de fluxo (Gomes *et al.*, 2010).

3.6. Estimulação *in vitro* de sangue total para detecção da produção de citocinas intracelular em monócitos.

Foi utilizado protocolo de mensuração de citocinas intracelular em sangue total (figura 5).

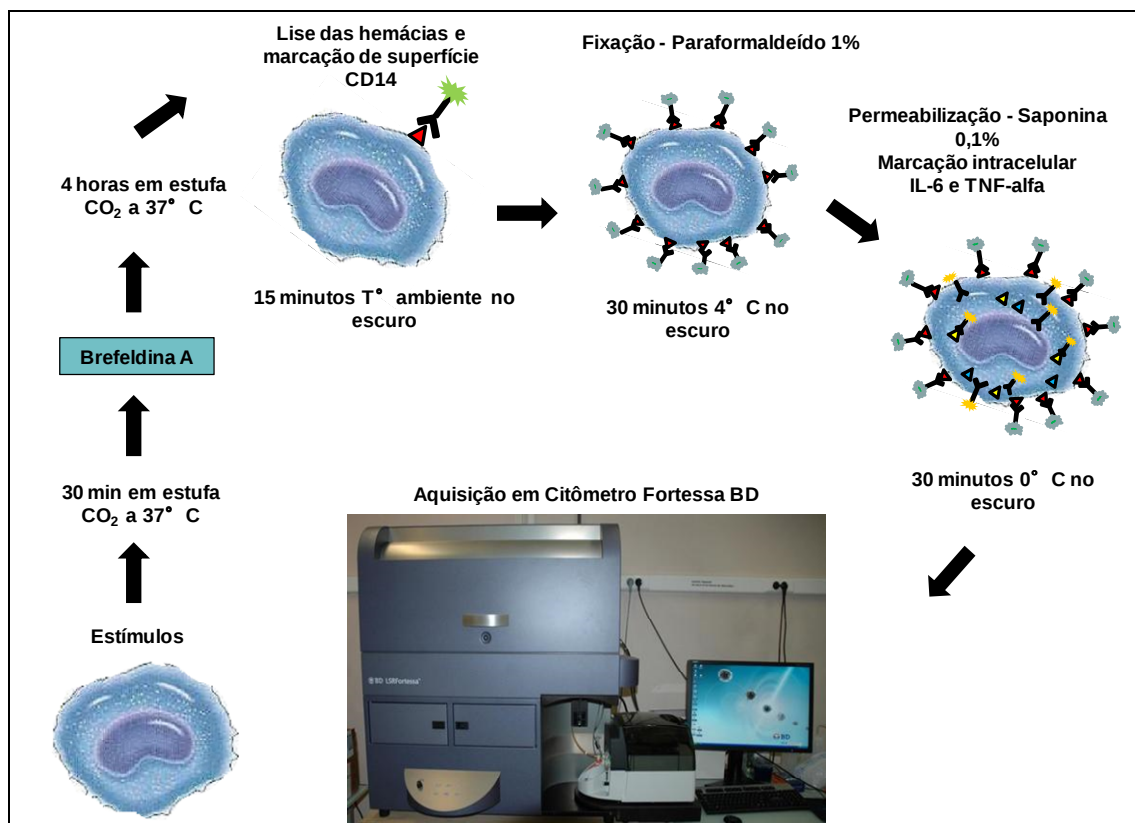


Figura 5: Reação esquemática para detecção de citocina intracelular.

Foram incubados 500µL de sangue diluído 1:2 em meio RPMI em tubos de polipropileno de 5mL e nas condições sem estímulo e estimulados com LPS (100ng/mL), *S. aureus* e *P. aeruginosa* (24x10⁸ células/mL), bactérias gram-positivas e gram-negativas, respectivamente. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 30 minutos a 37°C em estufa CO₂ a 5%. Em seguida, foram adicionados em cada tubo 5µL de brefeldina A na concentração final de 10µg/mL e os mesmos foram incubados por mais 4 horas. Foram feitas alíquotas de 200µL de sangue em tubos de polipropileno, acrescentado 2mL de PBS e então centrifugados a 800g por 5 minutos a 4°C.

Desprezado o sobrenadante, as hemácias foram lisadas com 2mL de solução de lise BD, durante 10 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas em 2mL de PBS e os tubos novamente centrifugados. As amostras foram marcadas com anticorpo monoclonal anti- CD14 (Tabela 4) e incubados por 15 minutos no escuro a temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas em 2mL de PBS, suspensas em 500µL de tampão de fixação e incubados por 20 minutos a 4°C no escuro. Os tubos foram novamente centrifugados e o sobrenadante descartado. As células foram suspensas em 50µL de tampão de permeabilização, receberam os anticorpos para marcação de citocinas intracelular IL-10, IL-6 e TNF- α (tabela 3) e incubadas por 30 minutos a 4°C no escuro. Após este período, as células foram lavadas em 2mL de tampão de permeabilização e suspensas em 300µL de tampão MACS para posterior análise em citômetro de fluxo.

Tabela 3: Condições utilizadas no ensaio de citocina intracelular em monócitos por citometria de fluxo.

	Incubação			Marcação Superfície			Marcação Intracelular		
	Sangue	Meio RPMI	Estímulo	Brefeldina A	CD14-PerCP	CD163-PE	IL-6 Fitc	TNF- α -PeCy7	eFluor450-IL-10
Controle	500µL	500µL		5µL	6µL	15µL	1µL	5µL	5µL
LPS	500µL	500µL	5µL	5µL	6µL	15µL	1µL	5µL	5µL
<i>P. aeruginosa</i>	500µL	500µL	37,5µL	5µL	6µL	15µL	1µL	5µL	5µL
<i>S. aureus</i>	500µL	500µL	37,5µL	5µL	6µL	15µL	1µL	5µL	5µL
Branco	500µL	500µL		5µL					
Isotipo	500µL	500µL		5µL	6µL	15µL_iso			

3.7. Estimulação *in vitro* de sangue total para mensuração de fagocitose em monócitos.

Para mensuração da fagocitose foi utilizado o kit PhagotestTM (Glycotope B biotechnology, Heidelberg, Alemanha). Foram incubados 100µL de sangue em 2tubos de polipropileno de 5mL (tubo controle e tubo teste) . Foi adicionado 20µL de *E. coli* opsonizada conjugada a FITC (reagente B). Os tubos foram homogeneizados e incubados em berço de gelo por 10 minutos. Dado o tempo de incubação a amostra teste foi colocada em banho-maria a 37°C por 10 minutos enquanto que o tubo controle permaneceu no gelo. Após esse período a amostra teste foi colocada novamente no berço de gelo. Foi adicionado 100µL de solução *quenching* (reagente C) previamente resfriado, em cada tubo. Os tubos foram e homogeneizados em vórtex. Foi realizada duas lavagens com 3mL de reagente A. Os tubos foram centrifugados a 800g por 5

minutos a 4°C e desprezado o sobrenadante. Realizou-se uma lise hipotônica com 2mL de reagente D, por 20 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 800g por 5 minutos a 4°C e desprezado o sobrenadante e realizado nova lavagem com 3mL de reagente A, seguida de nova centrifugação. Foi desprezado o sobrenadante e após homogeneização foi adicionado 200µL de solução DNA *staining* (reagente E) por tubo. As amostras foram incubadas em berço de gelo protegidas da luz por 10 minutos. Dado o tempo de incubação foi realizada aquisição em citômetro de fluxo e posterior análise.

3.8. Aquisição de dados para detecção da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), Óxido Nítrico (NO), produção de citocinas intracelular e fagocitose.

A leitura das amostras foi realizada no citômetro de fluxo LSRFORTESSA (BD Biosciences). A aquisição dos eventos foi realizada com o auxílio do programa FACSDiva (BD Biosciences).

3.8.1. EROs e NO

Para a aquisição dos dados foram utilizados dois gráficos de pontos (Figura 6) o primeiro, de dispersão frontal (escala linear) versus dispersão lateral de luz (escala logarítmica), foi determinado uma região P1 de morfologia característica de monócitos (Figura 6A). Utilizando-se outro gráfico de dispersão lateral de luz versus expressão de CD14 foi delimitada a região P2 para identificar eventos positivos para CD14 (marcador de monócitos - Figura 6B). Por meio da combinação das regiões P1 e P2 foram adquiridos 5000 eventos, os quais possuíam, portanto, morfologia de monócitos e positividade para CD14. Todos os eventos foram salvos.

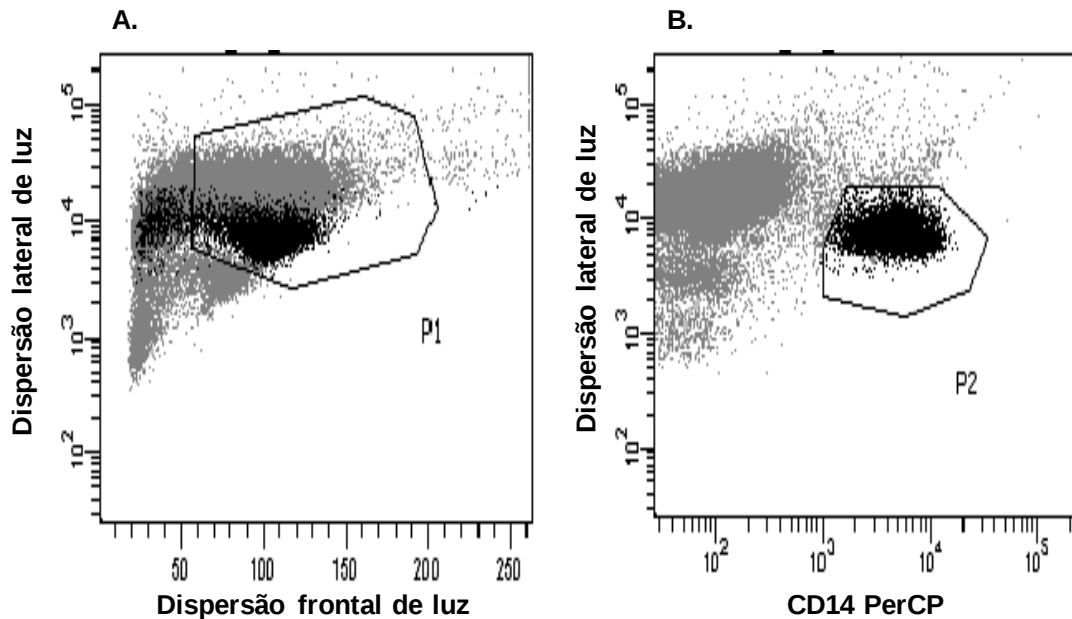


Figura 6: Estratégia de aquisição de monócitos em sangue total para detecção da produção de EROs e NO. O gráfico A mostra as dispersões frontal versus lateral de luz. A região 1 (P1) separa as populações de morfologia de monócitos. O gráfico B mostra a dispersão lateral de luz e a expressão de CD14. A região (P2) evidencia os monócitos CD14+

3.8.2. Citocinas intracelular:

Para a aquisição dos dados foram utilizados dois gráficos de pontos (Figura 7). O primeiro, de dispersão frontal (escala linear) versus dispersão lateral de luz (escala linear), foi determinado uma região P1 de morfologia característica de monócitos (Figura 7A). Utilizando-se outro gráfico de dispersão lateral de luz versus expressão de CD14 foi delimitada a região P2 para identificar eventos positivos para CD14 (marcador de monócitos - Figura 7B). Por meio da combinação das regiões P1 e P2 foram adquiridos 5000 eventos, os quais possuíam, portanto, morfologia de monócitos e positividade para CD14. Todos os eventos foram salvos.

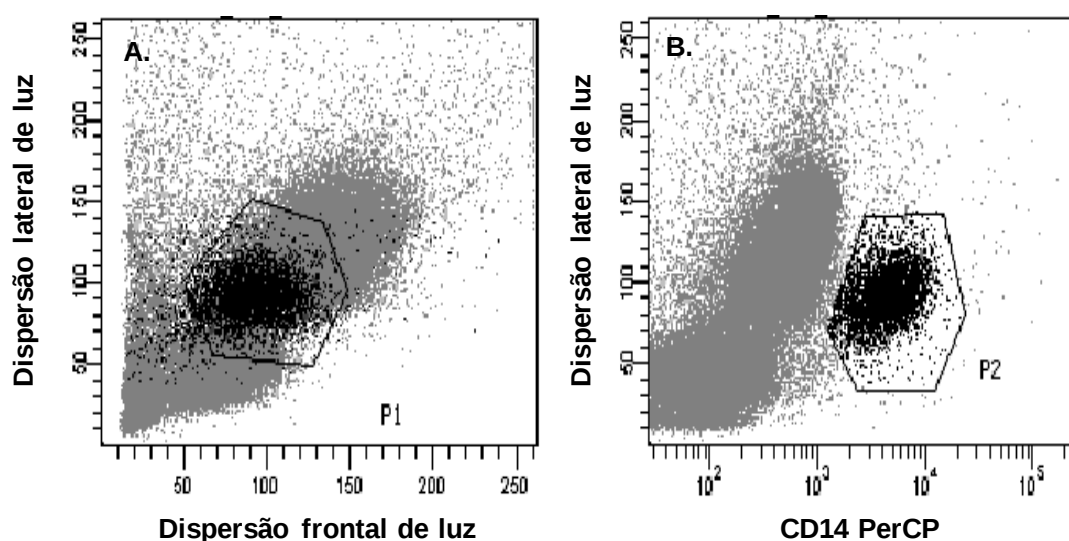


Figura 7: Estratégia de aquisição de monócitos em sangue total para detecção da produção de citocinas intracelular. O gráfico A mostra as dispersões frontal versus lateral de luz. A região 1 (P1) separa as populações de morfologia de monócitos. O gráfico B mostra a dispersão lateral de luz e a expressão de CD14. A região (P2) evidencia os monócitos CD14+.

3.8.3. Fagocitose

Para a aquisição dos dados foi utilizado um gráfico de dispersão frontal versus dispersão lateral de luz em escala linear onde foi determinada uma região P1 de morfologia característica de monócitos (Figura 8A). Utilizando-se outro gráfico do tipo histograma com positividade para o corante de DNA do kit foi delimitada a região P2 para eliminar as bactérias *E. coli* que não foram fagocitadas (Figura 8B). Por meio da combinação das regiões P1 e P2 foram adquiridos 15000 eventos. Todos os eventos foram salvos.

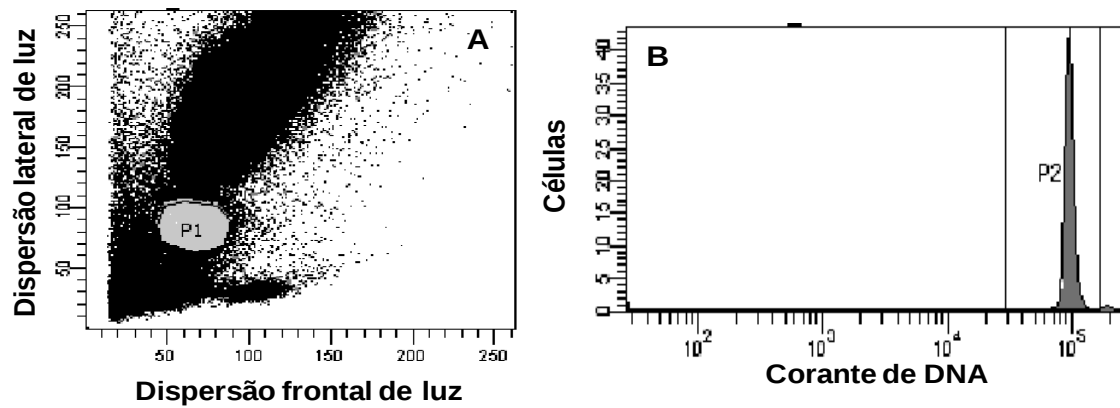


Figura 8: Estratégia de aquisição de monócitos em sangue total para mensuração da fagocitose. O gráfico A mostra as dispersões frontal versus lateral de luz. A região 1 (P1) separa as populações de morfologia de monócitos. O gráfico B delimita a região 1 excluindo excesso de bactérias *E. coli* que não foram fagocitadas.

3.9. Análise de dados da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), Óxido Nítrico (NO), produção de citocinas intracelular e fagocitose.

A análise dos resultados foi realizada com auxílio do programa FlowJo (Tree Star INC. Ashland, OR, EUA).

3.9.1. EROs, NO, IL-6, TNF- α e IL-10:

Para análise dos monócitos, células individuais (*singlets*) foram selecionadas e os monócitos foram caracterizados por dispersão lateral de luz e positividade para CD14. Os monócitos foram ainda caracterizados como células positivas e negativas para CD163. O quadrante de células CD163 foi estabelecido com base no tubo com isotipo controle. A produção de EROs e NO foi avaliada em monócitos e nos subconjuntos de monócitos CD163⁺ e CD163⁻ em gráficos do tipo histograma sendo a média geométrica de intensidade de fluorescência (MGIF) relacionada à detecção de DCFH ou DAF, respectivamente (Figura 9).

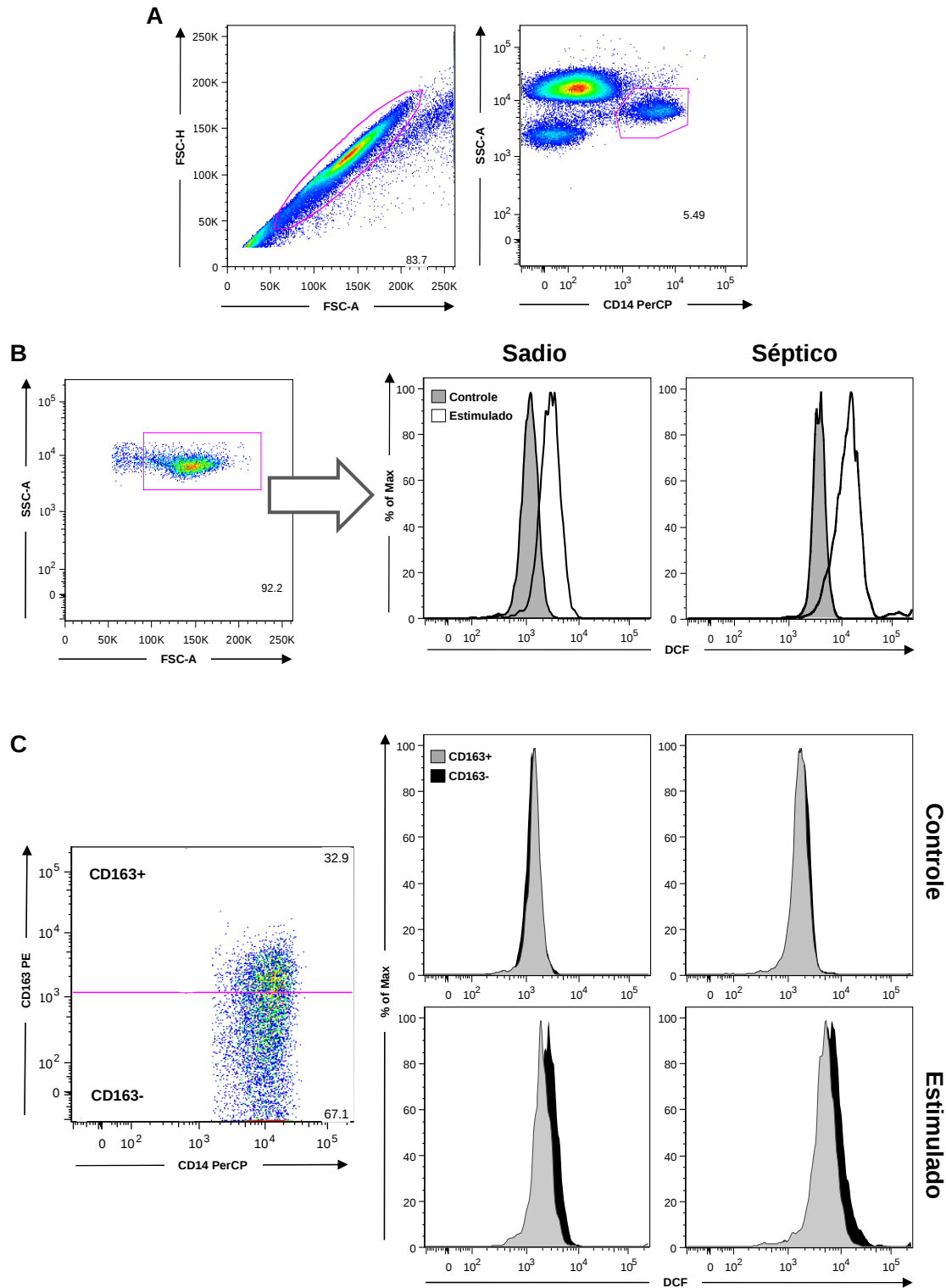
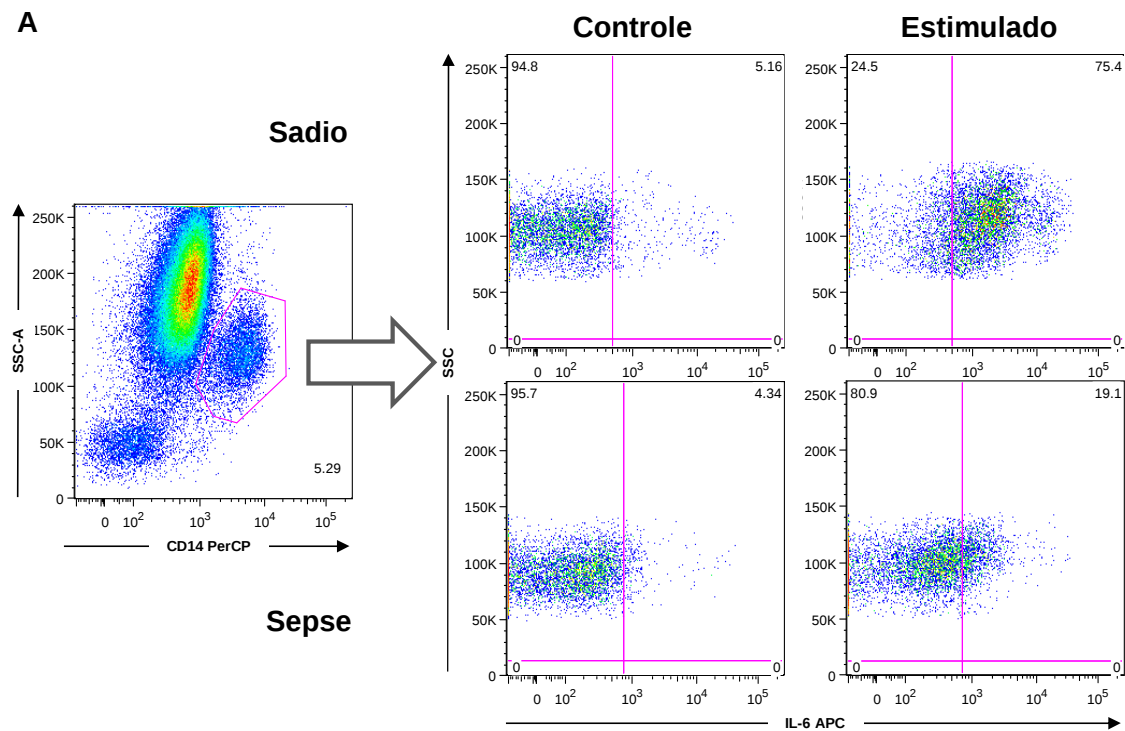


Figura 9: Estratégia de análise para detecção da produção de EROs e NO em monócitos e subpopulações. Células individuais (*singlets*) foram selecionadas e os monócitos foram caracterizados por dispersão lateral de luz e positividade para CD14 (A). Outro gráfico de dispersão lateral vs. Dispersão frontal de luz foi utilizada para excluir células menores (B). Para determinar a população de CD163, um tubo isotipo controle foi utilizado para determinar os quadrantes. Os resultados são apresentados como percentagem de células que expressam CD163 (C). Os monócitos CD14 + e subpopulações de monócitos CD14 + CD163 + e CD14 + CD163- foram avaliados em gráficos do tipo histograma onde a detecção DCF corresponde a produção de EROs. Os gráficos são representativos de um experimento para detecção de EROs em voluntários sadios e pacientes sépticos na situação controle e após estímulo com *P. aeruginosa*.

3.9.2. Citocinas:

Para análise dos monócitos, células individuais (*singlets*) foram selecionadas e os monócitos foram caracterizados por dispersão lateral de luz e positividade para CD14. Os monócitos foram ainda caracterizados como células positivas e negativas para CD163. O quadrante de células CD163 foi estabelecido com base no tubo com isotipo controle. A detecção das citocinas intracelulares foi analisada em monócitos e nos subconjuntos de monócitos CD163+ e CD163-, estas por sua vez foram avaliadas quanto à produção de citocinas IL-6, TNF- α e IL-10. Para ambas as análises foi utilizado o tubo sem estímulo para delimitar o quadrante onde se determinou o basal de produção de citocinas. Manteve-se esse quadrante para os tubos estimulados. Os resultados foram expressos em porcentagem de monócitos produtores de citocinas. (Figura 10).



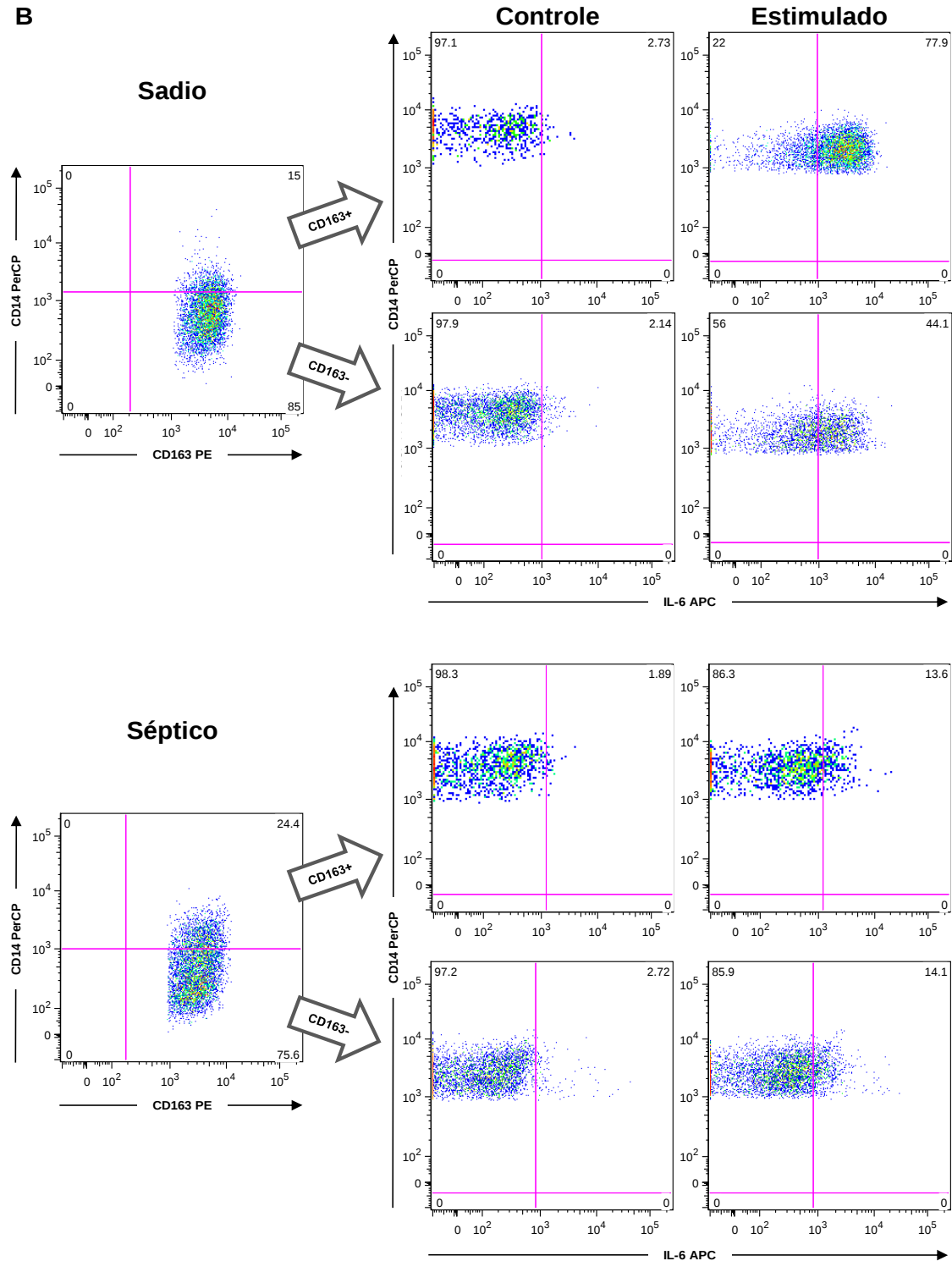


Figura 10: Estratégia de análise da produção de citocina intracelular em monócitos e subpopulações. Células individuais (*singlets*) foram selecionadas e os monócitos foram caracterizados por dispersão lateral de luz e positividade para CD14 (A). *Dot-plots* foram realizados com parâmetros de dispersão lateral de luz versus positividade para IL- 6.. Para determinar a população de CD163, um tubo isotipo controle foi utilizado para determinar os quadrantes (B). Os monócitos CD14 + e subpopulações de monócitos CD14 + CD163 + e CD14 + CD163- foram avaliados quanto à produção de citocinas. Os quadrantes para positividade das citocinas foram estabelecidos com base em células não estimuladas (controle). Os resultados são apresentados como porcentagem de células produtoras de citocinas. Os gráficos são representativos de um experimento para a detecção de IL - 6 em um voluntário sadio e um paciente séptico em células não estimuladas e após estímulo com *P. aeruginosa*.

3.9.3. Fagocitose

Para análise da fagocitose, os monócitos foram caracterizados pela combinação de células individuais (*singlets*) com parâmetros secundários de dispersão lateral vs. dispersão frontal de luz (figura 11A). Outro gráfico do tipo histograma foi utilizado para excluir restos de bactérias não fagocitadas. (Figura 11B). Os eventos contidos na combinação das regiões P1 e P2 foram analisados em outro gráfico de dispersão frontal versus dispersão lateral de luz onde se delimitou as células com tamanho e granularidade de monócitos (Figura 11C). Após estas combinações as células foram analisadas em um gráfico do tipo histograma sendo a média geométrica de intensidade de fluorescência (MGIF) relacionada à detecção de *E. coli* conjugada a FITC (figura 11D e E), ou seja, à mensuração da fagocitose. O valor de MGFI do tubo controle (gelo) foi subtraído do tubo teste (37°C).

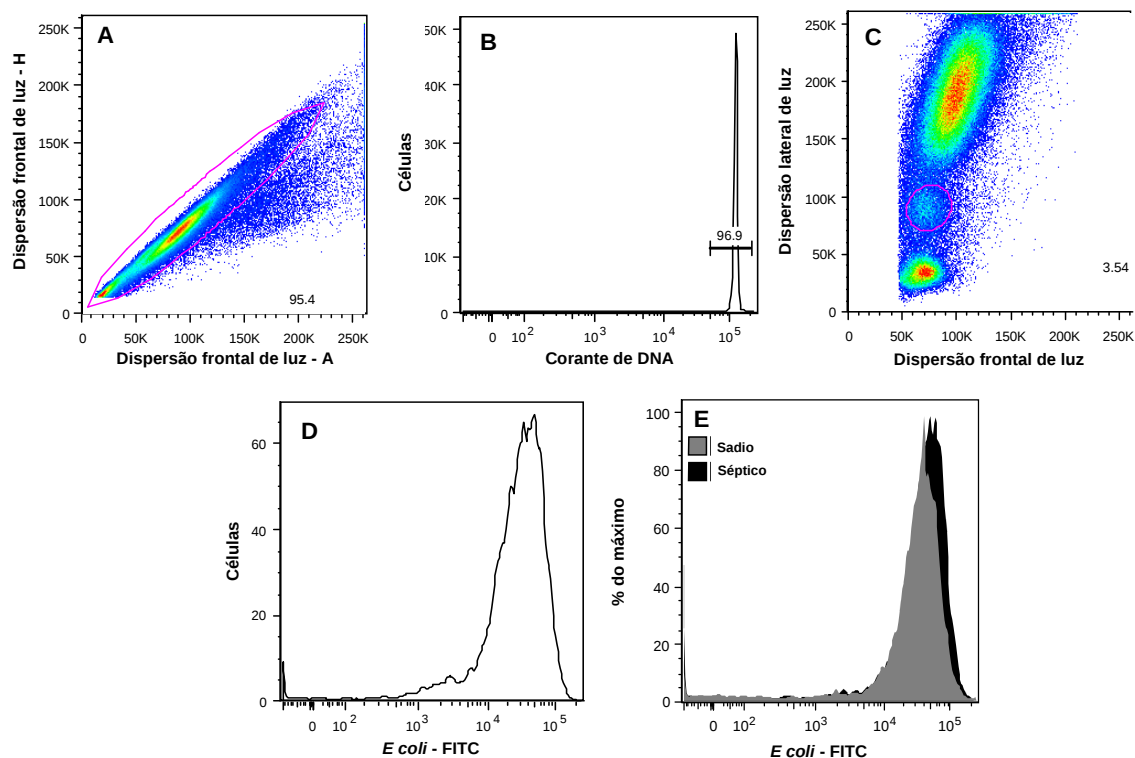


Figura 11: Estratégia de análise da mensuração de fagocitose em monócitos do sangue periférico. O gráfico A mostra a dispersão frontal altura versus área para evidenciar as células únicas presentes no *gate*. O gráfico B foi utilizado para excluir restos de bactérias não fagocitadas. O gráfico C mostra a dispersão lateral de luz versus dispersão frontal de luz onde se delimitou a população de monócitos. As células (monócitos) separadas pela estratégia dos gráficos anteriores são analisadas quanto à capacidade de fagocitose (D). O gráfico E evidencia a fagocitose em indivíduos saudáveis (cinza) e pacientes sépticos (preto).

3.10. Imunofluorescência para observação da co-localização da gp91phox e p47phox.

Foi coletado sangue em tubo contendo anticoagulante EDTA e realizado separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) (protocolo Anexo 2) com uso de Ficoll Paque Plus. As células foram armazenadas em nitrogênio líquido. Após descongelamento as células foram aderidas em lâmina de vidro com polisina 0,01%. Em seguida, foram fixadas com paraformaldeído 4% e lavadas com solução salina tamponada fosfatada (PBS). O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com soro de cavalo (1:50) e albumina sérica bovina 1%. Utilizaram-se os anticorpos primários: anti-Nox2 feito em cabra (1:200), anti- p47 (1:100) e anti-p65 (1:200) feitos em coelho. Os anticorpos foram utilizados em associação ou isoladamente conforme a necessidade de co-localização. Após 12 horas de incubação com anticorpo primário, as células foram incubadas com anticorpos secundários específicos conjugados a Alexa fluor 594 (1:400) e/ou Alexa fluor 488 (1:100). O núcleo foi corado com 4, 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) à 1mM para otimizar a leitura realizada no microscópio confocal SP5 (Leica, EUA). As imagens foram analisadas no programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA) utilizando o plugin colocalizationanalysis/colocalizationhighligter (colocalized points-8 bit). Utilizando-se tal ferramenta, os pontos de co-localização da p47phox e da gp91phox foram expressos em uma nova imagem gerada. A partir desta última foi quantificada a média de intensidade de fluorescência correspondente de duas a quatro células/paciente em campos selecionados aleatoriamente.

Foi realizada uma purificação de monócitos (protocolo Anexo 3), a partir de PBMC de dois indivíduos sépticos (purificação >90%) e um indivíduo sadio (purificação >70%). A imunofluorescência confirmou uma presença de co-localização nos monócitos.

3.11. Análise estatística

Os resultados analisados no programa Flowjo foram exportados para uma planilha Excel e a análise estatística foi realizada utilizando-se o pacote estatístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences v 19.0) (IBM, Armonk, NY, EUA).

Todas as variáveis foram testadas quanto à sua normalidade pelo teste Shapiro Wilk e apresentaram distribuição não normal.

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

A interação de CD163 com EROs, NO, IL-6, IL-10 e TNF- α foram analisadas pelo teste de medidas repetidas (ANOVA) com o pós-teste de Bonferroni .

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

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Perfil geral da coorte

Foram incluídos no estudo 34 pacientes dos quais 55,9% apresentaram quadro de sepse grave e 44,1% de choque séptico.

Destes 52,9% são do gênero masculino, com média de idade de $62,44 \pm 19$ (com idade mínima de 25 e máxima de 92 anos). Dos pacientes incluídos, 15 foram submetidos a uma nova coleta após sete dias de seguimento (D7).

As principais fontes de infecção foram o trato respiratório (47,1%), trato urinário (23,5%), abdômen (20,6%) e outros (3%). A média do escore *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) foi 5,47 variando de 0 a 16. A mortalidade dos pacientes foi de 11,8%.

Também foram incluídos 19 indivíduos sadios de idade e gênero semelhantes aos pacientes ($P=0,504$ - Mann-Whitney). Destes, 52,6% são do gênero masculino com média de idade de $59,9 \pm 16,8$ (com idade mínima de 30 e máxima de 88 anos).

4.2. Comparação entre indivíduos sadios e pacientes sépticos.

4.2.1. Análise da fagocitose por monócitos do sangue periférico de pacientes na coleta do D0 em relação aos indivíduos sadios.

Não houve diferença na fagocitose de monócitos quando comparados o grupo de indivíduos sadios e pacientes sépticos no D0 (Mediana, GMFI, 15.499; *range* 8.722-24.879; Mediana, GMFI, 19.707; *range* 5.207-35075, respectivamente; $P=0,178$).

4.2.2. Análise da produção de EROs, NO, IL-6 e IL-10 TNF- α por monócitos do sangue periférico de pacientes na coleta do D0 em relação aos indivíduos sadios.

A produção de EROs e NO pelos monócitos foi maior nos pacientes sépticos do que em controles sadios em todas as situações avaliadas. Em contraste a porcentagem de monócitos produtores de IL-6 e TNF- α foi menor nos pacientes sépticos do que nos controles sadios após estímulo com LPS, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (Tabela 4).

Não foi observada diferença estatística quanto à produção de IL-10 entre indivíduos sadios ($n=12$) e pacientes sépticos ($n=12$).

Tabela 4: Produção de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, IL-6, TNF- α e IL-10 por monócitos do sangue periférico de pacientes na coleta do D0 em relação aos indivíduos saudáveis.

	Pacientes Sépticos					Indivíduos Sadios					P
	Média	DP	Mediana	Percentis 25-75		Média	DP	Mediana	Percentis 25-75		
EROs (GMFI)											
Sem estímulo	3231	2178	2459	1735	4546	1182	640	1005	761	1487	< 0,001
LPS	4154	2667	3387	2049	6205	1289	778	1177	829	1503	< 0,001
<i>P. aeruginosa</i>	4644	3068	3972	2257	6514	1448	839	1372	928	1560	< 0,001
<i>S. aureus</i>	13401	11569	9296	5573	18507	2924	1682	2479	1749	3275	< 0,001
NO (GMFI)											
Sem estímulo	558	331	479	362	621	244	94	209	176	305	< 0,001
LPS	674	403	572	448	792	309	94	284	243	389	< 0,001
<i>P. aeruginosa</i>	1116	676	917	631	1493	543	188	517	422	667	< 0,001
<i>S. aureus</i>	949	507	840	617	1103	460	198	372	309	663	< 0,001
IL-6 (%)											
Sem estímulo	4,5	3,7	3,3	2,1	5,7	5,4	4,2	3,8	3,2	6,4	0,249
LPS	25,1	23,8	10,9	4,9	41,2	66,7	17,1	70,8	60,2	77,5	< 0,001
<i>P. aeruginosa</i>	29,2	25,1	24,1	4,9	51,8	67,4	13,7	70,4	54,1	78,1	< 0,001
<i>S. aureus</i>	16,1	15,1	9,6	4,1	25,1	28,0	12,2	24,8	18,9	41,9	0,002
TNF-α (%)											
Sem estímulo	1,6	1,3	1,3	0,7	2,3	3,3	2,7	2,6	1,6	4,2	0,004
LPS	23,3	19,0	18,6	6,5	36,2	62,4	12,3	66,7	47,8	72,1	< 0,001
<i>P. aeruginosa</i>	37,3	23,0	33,4	17,5	56,8	73,4	11,6	70,7	61,4	86,8	< 0,001
<i>S. aureus</i>	24,6	19,1	19,6	9,3	42,4	34,3	9,3	33,6	26,5	43,9	0,023
IL-10 (%)											
Sem estímulo	3,9	2,1	3,3	2,5	4,5	4,8	2,6	4,1	3,4	7,3	0,347
LPS	6,5	3,4	5,9	4,6	7,6	9,5	8,3	7,4	3,6	13,6	0,443
<i>P. aeruginosa</i>	14,0	8,1	12,3	9,0	19,3	16,6	8,1	16,3	8,4	22,4	0,478
<i>S. aureus</i>	7,9	4,9	7,8	5,4	8,9	9,7	5,7	9,1	5,4	11,6	0,347

4.3. Comparação entre indivíduos sadios, pacientes em sepse grave e choque séptico.

4.3.1. Análise da fagocitose por monócitos do sangue periférico de indivíduos sadios, pacientes em sepse grave e choque séptico na coleta do D0.

Não houve diferença na fagocitose de monócitos na comparação entre indivíduos sadios e quando os pacientes foram classificados em sepse grave e choque séptico: Sadios (mediana, GMFI, 15.499; *range* 8.722-24.879), sepse grave (mediana, GMFI, 23.733; *range* 6.118-35.075) e choque séptico (mediana, GMFI, 17.116; *range* 5.207-32.877) ($P=0,112$).

4.3.2. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos do sangue periférico de indivíduos sadios, pacientes em sepse grave e choque séptico na coleta do D0.

Foi observada diferença estatística quando comparados os três grupos estudados – indivíduos sadios, sepse grave e choque séptico quanto à produção de espécies reativas de oxigênio em todas as condições analisadas: $P<0,001$ (Kruskal Wallis). Quando os grupos foram analisados dois a dois, observou-se que a produção de EROs foi maior nos grupos de pacientes em sepse grave e choque séptico em relação ao grupo de indivíduos sadios. Sadios versus sepse grave: Controle ($P=0,003$), LPS ($P=0,001$), *P. aeruginosa* ($P<0,001$) e *S. aureus* ($P<0,001$). Sadios versus choque séptico: Controle ($P<0,001$), LPS ($P<0,001$), *P. aeruginosa* ($P<0,001$) e *S. aureus* ($P<0,001$). Quando comparamos os grupos de pacientes a produção de EROs foi no maior nos pacientes com choque séptico comparado aos pacientes com sepse grave nas seguintes situações: Controle: ($P=0,009$); LPS: ($P=0,011$) e *P. aeruginosa*: ($P=0,024$) (Figura 12).

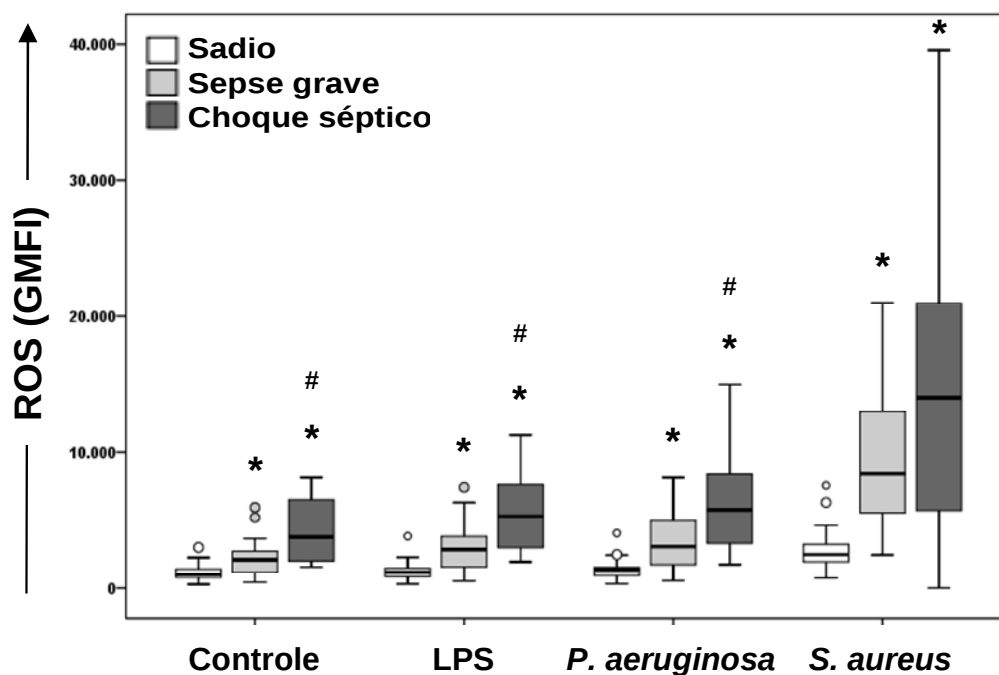


Figura 12: Metabolismo oxidativo de monócitos do sangue periférico de 10 indivíduos sadios (caixas em branco), 19 pacientes em sepse grave (caixas em cinza claro) e 10 pacientes em choque séptico (caixas em cinza escuro). Os monócitos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência (MGFI) da detecção de DCFH. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). $P < 0,001$ para todos os estímulos na comparação entre os grupos (Kruskal-wallis). * $P < 0,05$ em relação aos sadios, # $P < 0,05$ em relação à sepse grave (Mann-Whitney).

4.3.3. Análise da produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis, pacientes em sepse grave e choque séptico na coleta do D0.

Foi observada diferença estatística quando comparados os três grupos estudados – indivíduos saudáveis, sepse grave e choque séptico quanto a produção de óxido nítrico em todas as condições analisadas: $P < 0,001$ (Kruskal Wallis). Quando os grupos foram analisados separadamente, observou-se que a produção de NO foi maior no grupo de pacientes tanto em sepse grave quanto em choque séptico em relação ao grupo de indivíduos saudáveis. Saudáveis versus sepse grave: Controle ($P < 0,001$), LPS ($P = 0,001$), *P. aeruginosa* ($P = 0,008$) e *S. aureus* ($P = 0,001$). Saudáveis versus choque séptico: $P < 0,001$ para todas as situações avaliadas. Não foi observada diferença estatística entre os grupos de pacientes em nenhuma das situações avaliadas (Figura 13).

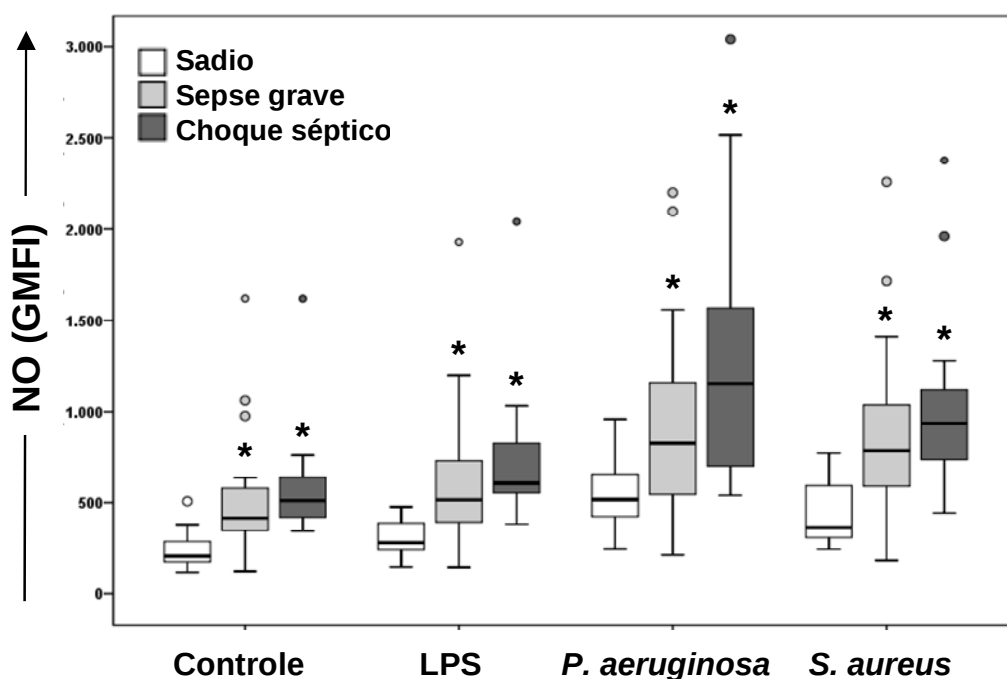


Figura 13: Produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de 10 indivíduos saudáveis (caixas em branco), 19 pacientes em sepse grave (caixas em cinza claro) e 10 pacientes em choque séptico. Os monócitos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência (MGFI) da detecção de DAF. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). $P < 0,001$ para todos os estímulos na comparação entre os grupos (Kruskal-wallis). * $P < 0,05$ em relação aos saudáveis, # $P < 0,05$ em relação a sepse grave (Mann-Whitney).

4.3.4. Análise da porcentagem de monócitos produtores de IL-6 do sangue periférico de indivíduos saudáveis, pacientes em sepse grave e choque séptico na coleta do D0.

Foi observada diferença estatística quando comparados os três grupos estudados – indivíduos saudáveis, sepse grave e choque séptico quanto à produção IL-6 em todas as condições analisadas: $P < 0,001$ (Kruskal Wallis). Quando os grupos foram analisados separadamente, observou-se que a produção de IL-6 foi menor nos grupos de pacientes do que no grupo de indivíduos saudáveis em algumas situações avaliadas. Saudáveis versus sepse grave nas situações: LPS ($P < 0,001$), *P. aeruginosa* ($P < 0,001$) e *S. aureus* ($P = 0,029$). Saudáveis versus choque séptico: LPS ($P < 0,001$), *P. aeruginosa* ($P < 0,001$) e *S. aureus* ($P = 0,001$). Não houve diferença estatística entre os grupos de pacientes. (Figura 14).

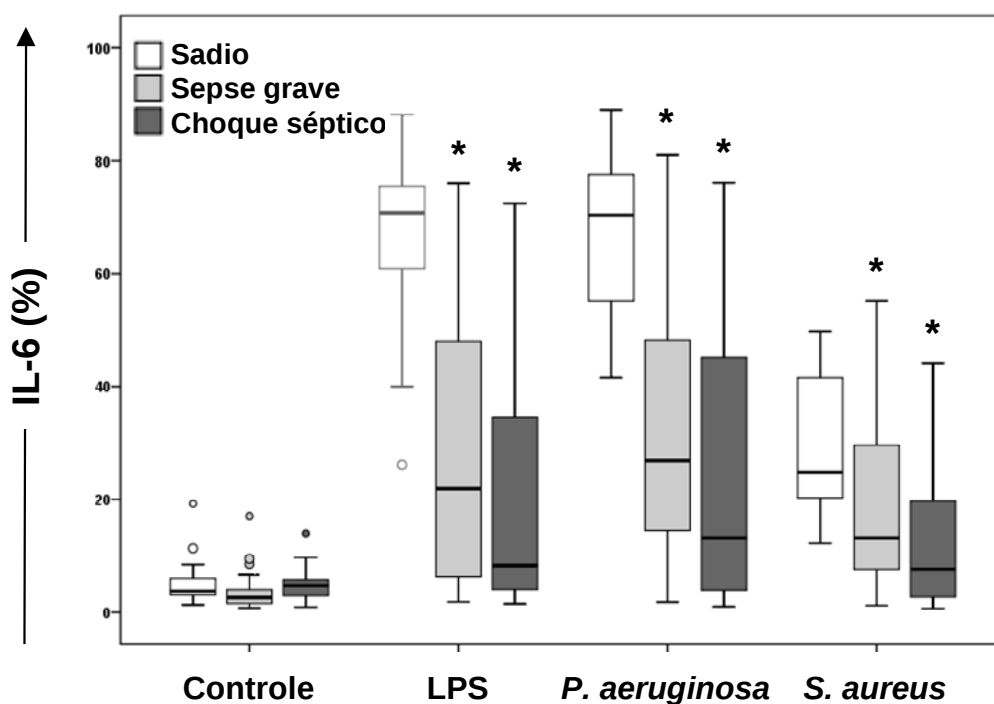


Figura 14: Porcentagem de monócitos produtores de IL-6 do sangue periférico de 10 indivíduos saudáveis (caixas em branco), 19 pacientes em sepse grave (caixas em cinza claro) e 10 pacientes em choque séptico. Os monócitos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). $P < 0,05$ para todas as situações avaliadas na comparação entre os grupos (Kruskal-wallis). * $P < 0,05$ em relação aos saudáveis e # $P < 0,05$ em relação à sepse grave (Mann-Whitney).

4.3.5. Análise da porcentagem de monócitos produtores de TNF- α do sangue periférico de indivíduos saudáveis, pacientes em sepse grave e choque séptico na coleta do D0.

Foi observada diferença estatística quando comparados os três grupos estudados – indivíduos sadios, sepse grave e choque séptico quanto à produção TNF- α nas seguintes condições analisadas: LPS ($P<0,001$), *P. aeruginosa* ($P<0,001$) e *S. aureus* ($P<0,001$) (Kruskal Wallis). Quando os grupos foram analisados separadamente, observou-se que a produção de TNF- α foi menor nos grupos de pacientes do que no grupo de indivíduos sadios em algumas situações avaliadas. Sadios versus sepse grave nas situações: LPS ($P<0,001$) e *P. aeruginosa* ($P<0,001$). Sadios versus choque séptico: LPS ($P<0,001$), *P. aeruginosa* ($P<0,001$) e *S. aureus* ($P=0,001$). Houve diferença estatística entre os grupos de pacientes. A produção de TNF- α foi menor no grupo de pacientes em choque séptico quando comparado ao grupo de pacientes em sepse grave nas situações após estímulos: LPS ($P=0,012$), *P. aeruginosa* ($P<0,015$) e *S. aureus* ($P<0,015$) (Figura 15).

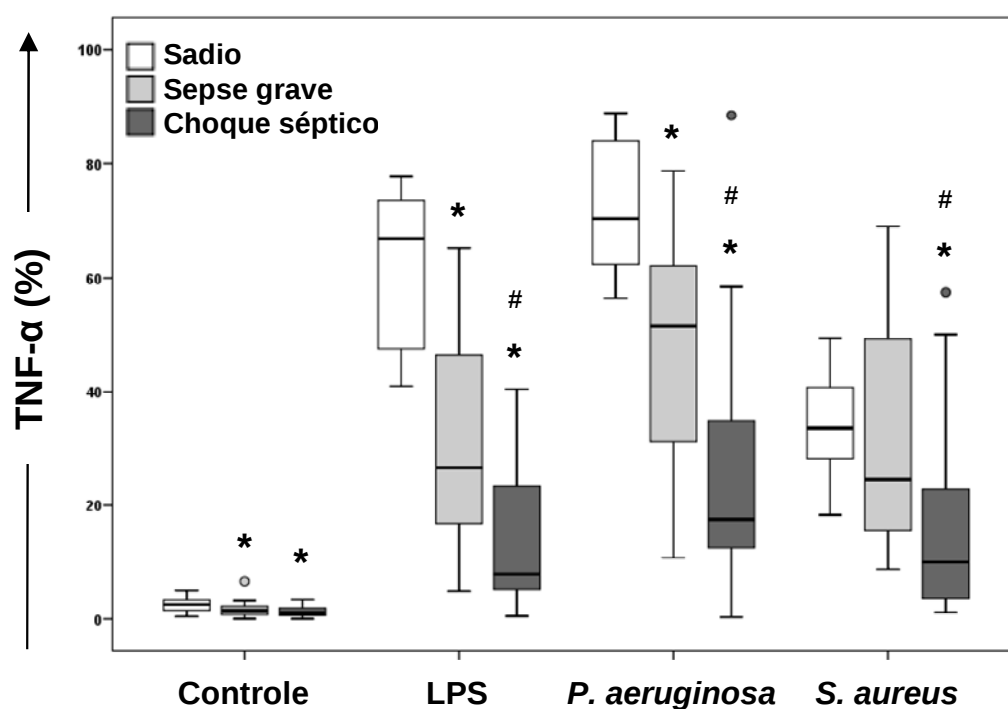


Figura 15: Porcentagem de monócitos produtores de TNF- α do sangue periférico de 10 indivíduos sadios (caixas em branco), 19 pacientes em sepse grave (caixas em cinza claro) e 10 pacientes em choque. Os monócitos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). $P < 0,05$ para todas as situações avaliadas na comparação entre os

grupos (Kruskal-wallis). * $P < 0,05$ em relação aos sadios e # $P < 0,05$ em relação à sepse grave (Mann-Whitney).

4.4. Correlação entre SOFA e espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, IL-6 e TNF- α em monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos na coleta do D0.

A geração de EROs se correlaciona positivamente com a pontuação do score SOFA nas seguintes condições Controle e após estímulos com LPS e *P. aeruginosa*) (Figura 16) enquanto nenhuma correlação foi encontrada entre o escore de disfunção de órgão com qualquer outra função das células avaliadas, em todas as condições testadas: NO (Controle: $P=0,106$; LPS: $P=0,112$; *P. aeruginosa*: $P=0,192$ e *S. aureus*: $P=0,196$), TNF- α (LPS: $P=0,272$; *P. aeruginosa*: $P=0,132$ e *S. aureus*: $P=0,303$) ou IL-6 (LPS: $P=0,641$; *P. aeruginosa*: $P=0,598$ e *S. aureus*: $P=0,606$) (Teste de Correlação de Pearson)

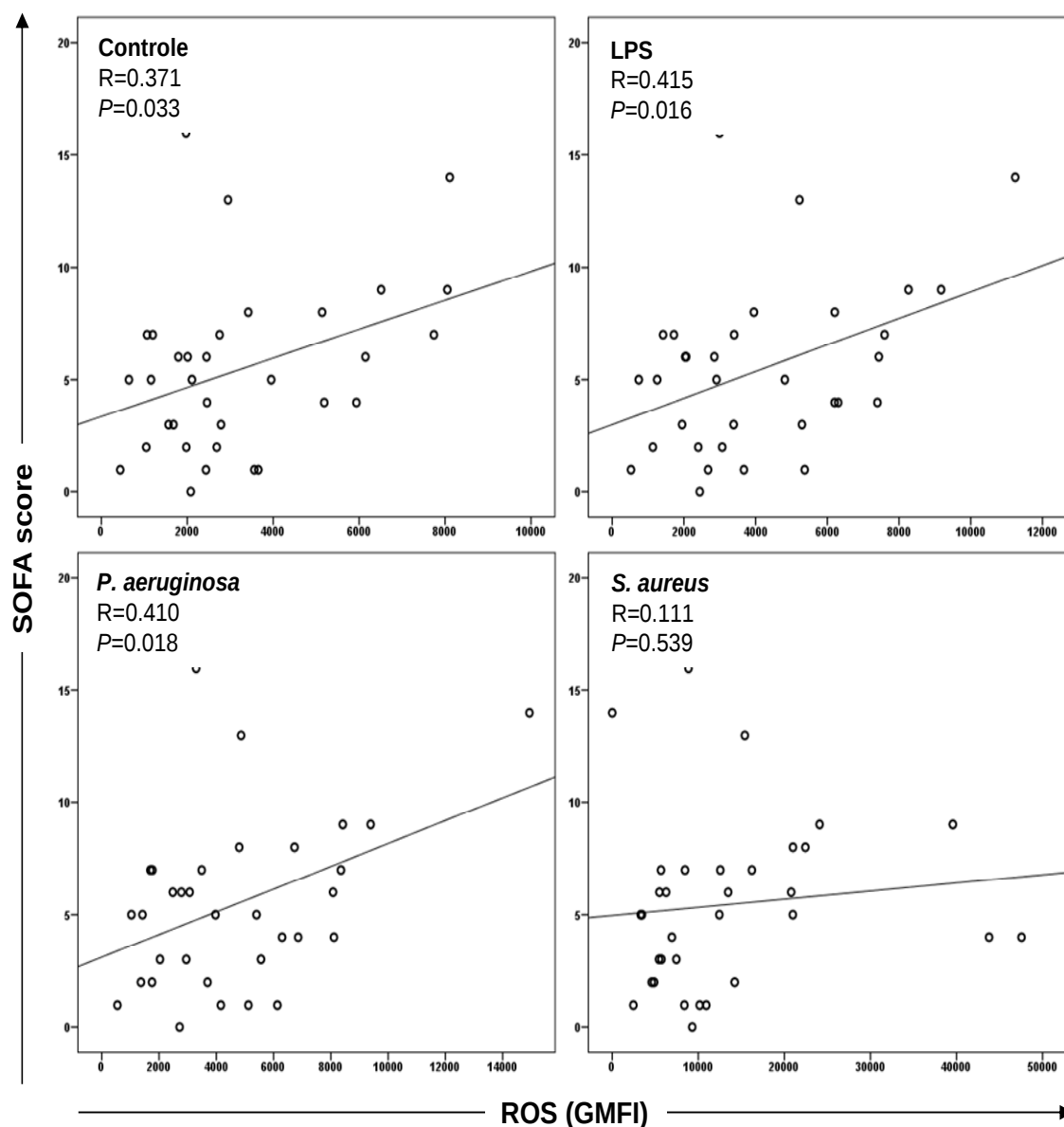


Figura 16: Correlação entre o escore SOFA e produção de ERO em monócitos de sangue total. Os dados representam a geração de EROs em amostras de admissão de 34 pacientes sépticos sob diferentes estímulos e o escore SOFA na admissão na UTI. Foi utilizado o teste de correlação de Pearson. O gráfico mostra o valor de P e R obtido.

4.5. Análise da interação da produção de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, IL-6 e TNF- α em monócitos CD163⁺ e CD163⁻ do sangue periférico de pacientes na coleta do D0 em relação aos indivíduos saudáveis.

Foi avaliado se as diferenças na modulação da geração de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico e das citocinas inflamatórias IL-6 e TNF- α observada entre pacientes sépticos e voluntários saudáveis foram influenciadas pela expressão de CD163 em monócitos. Em geral, monócitos CD163⁺ produziram quantidades mais elevadas de IL-6 e TNF- α e quantidades menores de EROs e NO. Uma interação entre a expressão dos receptores e os grupos de pacientes foi encontrada na situação após estímulo com LPS e *S. aureus* (para TNF- α e IL - 6) e com *P. aeruginosa* (para o TNF- α). Monócitos CD163⁺ produziram maiores quantidades de citocinas que os monócitos CD163⁻ tanto no paciente séptico quanto nos indivíduos saudáveis e, inversamente, a produção em voluntários saudáveis foi maior do que em pacientes sépticos em todas as situações em monócitos CD163⁻ após estímulo com *S. aureus*. Interação também foi encontrada após estímulos com *S. aureus* e *P. aeruginosa* em relação à geração de EROs. Neste caso, as diferenças entre as células CD163⁺ e CD163⁻ foi observada apenas em pacientes sépticos; com ambos os estímulos a geração de EROs foi maior nos sépticos do que nos voluntários saudáveis para os monócitos CD163⁺ e CD163⁻. Nenhuma interação foi encontrada em relação à geração de NO, sendo que valores maiores foram observados nas células CD163⁺ (figura 17).

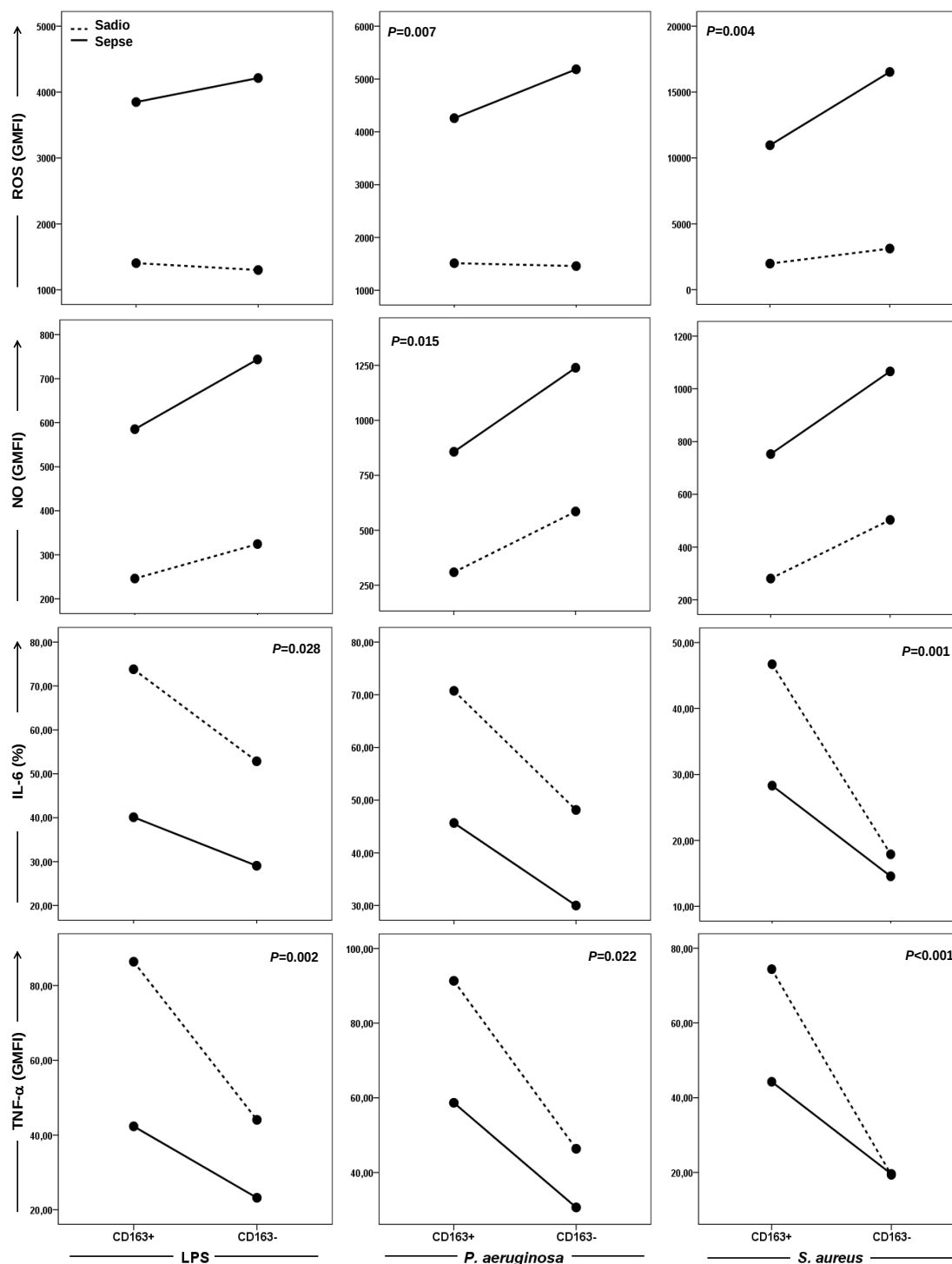


Figura 17: Interação da expressão de CD163 com a produção de EROs, NO, IL-6 e TNF-α em monócitos. Sangue total de 34 pacientes sépticos (D0) (linha contínua) e 19 voluntários sadios (linha pontilhada) foram analisadas após estímulo com LPS, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Os monócitos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. Os monócitos foram ainda caracterizados como células CD163 positivas e CD163 negativas. As produções de EROs e NO foram analisadas em gráficos do tipo histograma e quantificada como a média geométrica intensidades de fluorescência (GMFIs) associados com a detecção de DCFH e DAF, respectivamente. Nível de citocina intracelular foi baseado em quadrantes estabelecidos na amostra sem estímulo e são expressos como a porcentagem de monócitos produtores de citocinas. * Os valores de P indicam a interação entre a expressão de CD163 e os grupos de voluntários saudáveis e em pacientes sépticos para cada parâmetro e condição avaliada (ANOVA).

4.6. Avaliações durante o seguimento dos pacientes em sepse nas amostras D0 e D7.

4.6.1. Análise da fagocitose por monócitos do sangue periférico de pacientes nas coletas D0 e D7.

Não houve diferença na fagocitose de monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos na coleta D0 e após sete dias de seguimento (Mediana, GMFI, 19.473; *range* 5.207-35075; Mediana, GMFI, 18.887; *range* 6.023-31.803, respectivamente; $P=0,875$).

4.6.2. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos do sangue periférico de pacientes nas coletas D0 e D7.

A figura 18 mostra a produção de espécies reativas de oxigênio em monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos na coleta (D0) e após sete dias de seguimento (D7). A produção de EROs foi menor no D7 comparado ao D0 em todas as situações avaliadas: Controle: ($P=0,030$); LPS: ($P=0,019$); *P. aeruginosa*: ($P=0,013$) e *S. aureus*: ($P=0,048$) (figura 18).

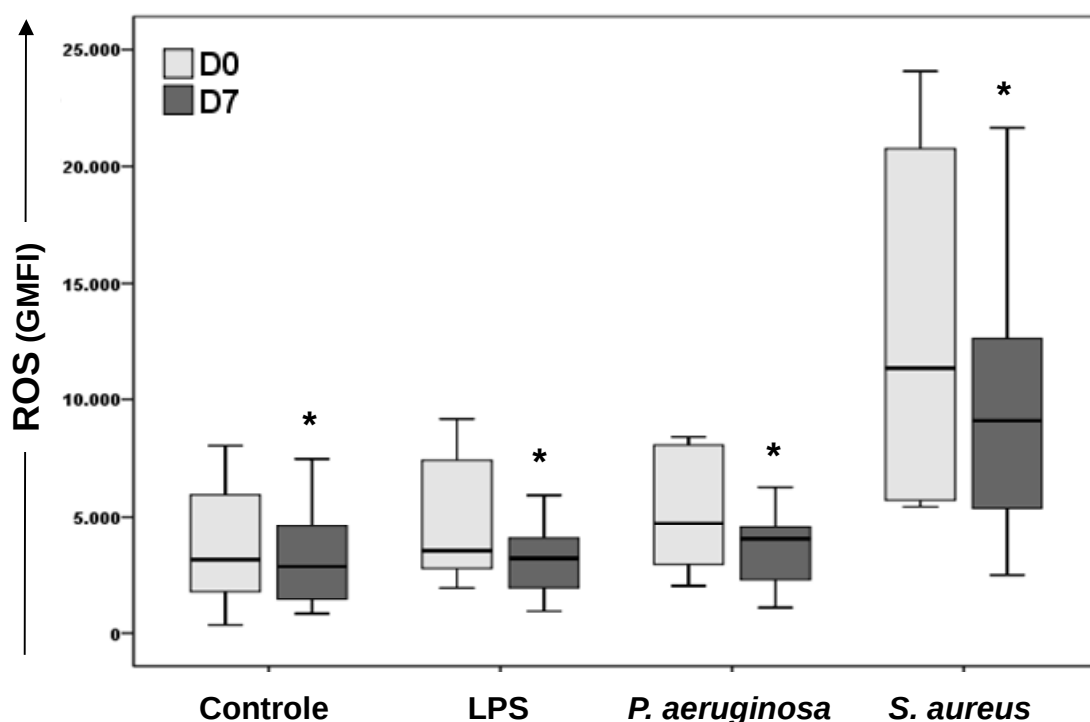


Figura 18: Metabolismo oxidativo de monócitos do sangue periférico de 15 pacientes sépticos nas coletas do D0 e D7. Os monócitos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência (MGFI) da detecção de DCFH. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). $P < 0,05$ comparado ao D0 (Wilcoxon).

4.6.3. Análise da produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de pacientes nas coletas D0 e D7.

A figura 19 mostra a produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de pacientes sépticos na coleta (D0) e após sete dias de seguimento (D7). A produção de NO foi menor no D7 comparado ao D0 na situação após estímulo com *P. aeruginosa* ($P=0,023$) (figura 19).

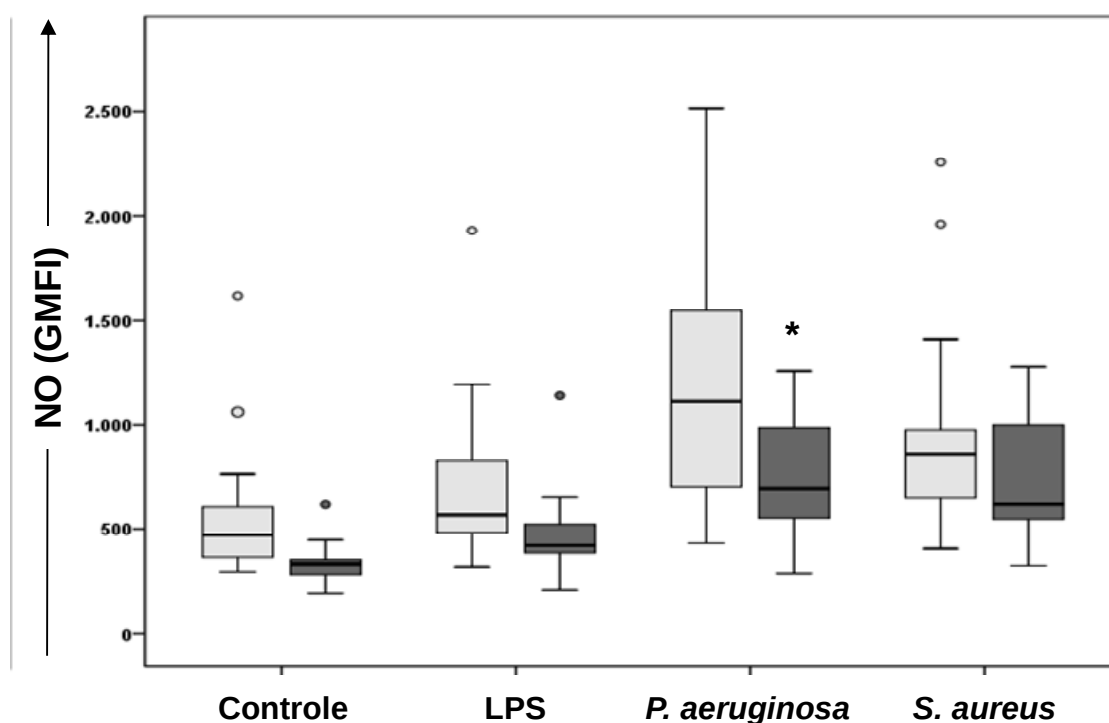


Figura 19: Produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de 15 pacientes sépticos nas coletas do D0 e D7. Os monócitos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência (MGFI) da detecção de DAF. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). $P<0,05$ comparado ao D0 (Wilcoxon).

4.6.4. Análise da porcentagem de monócitos produtores de IL-6 do sangue periférico de pacientes nas coletas D0 e D7.

A porcentagem de monócitos produtores de IL-6 foi maior na coleta D7 comparado ao D0. Foi observada significância estatística em todas as condições avaliadas: LPS ($P=0,017$), *P. aeruginosa* ($P=0,023$) e *S. aureus* ($P=0,004$) (figura 20).

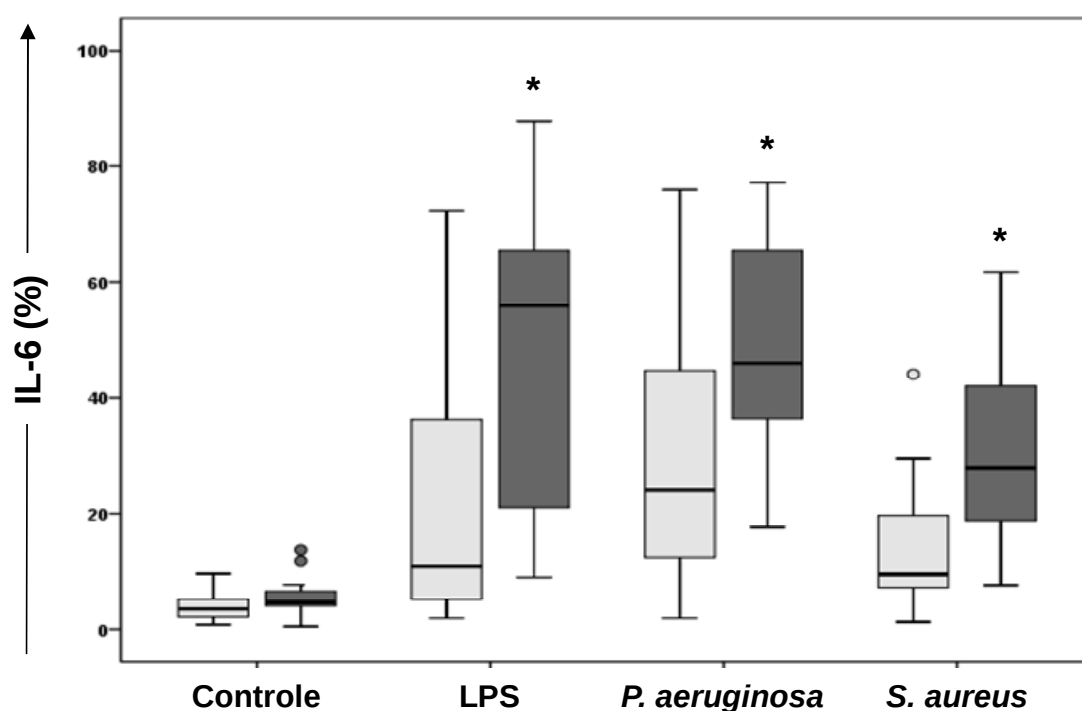


Figura 20: Porcentagem de monócitos produtores de IL-6 do sangue periférico de 15 pacientes sépticos nas coletas do D0 e D7. Sangue total foi incubado por 4 horas sem estímulo e estimulado com LPS, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Os monócitos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas) e mediana dos grupos. $P<0,05$ comparado ao D0 (Wilcoxon).

4.6.5. Análise da porcentagem de monócitos produtores de TNF- α em sangue periférico de pacientes nas coletas D0 e D7.

A porcentagem de monócitos produtores de TNF- α foi maior na coleta D7 quando comparado a D0. Foi observada significância estatística em todas as condições avaliadas: LPS: ($P=0,008$), *P. aeruginosa* ($P=0,031$) e *S. aureus* ($P=0,015$) (figura 21).

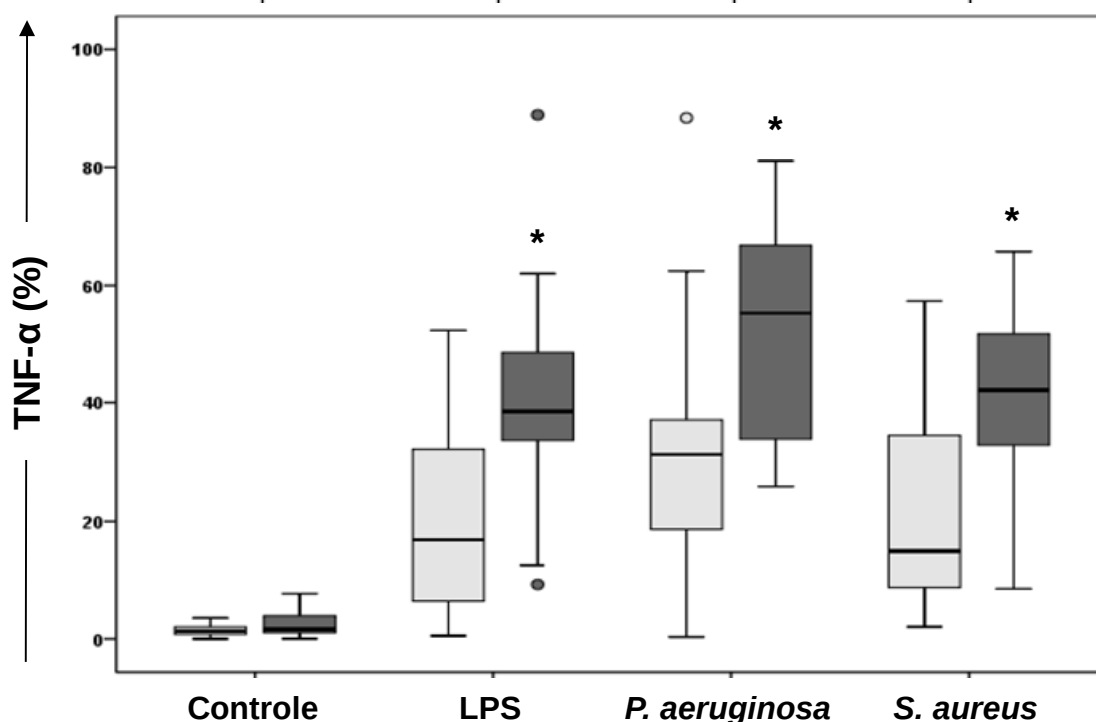


Figura 21: Porcentagem de monócitos produtores de TNF- α em sangue periférico de 15 pacientes sépticos nas coletas do D0 e D7. Sangue total foi incubado por 4 horas sem estímulo e estimulado com LPS, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Os monócitos foram analisados combinando-se tamanho e complexidade das células e positividade para CD14. Estão representados os valores máximos e mínimos, o percentil 25% e 75% (caixas), mediana dos grupos e valores extremos (círculos). * $P<0,05$ $P<0,05$ comparado ao D0 (Wilcoxon).

4.7. Imunofluorescência para observação da co-localização da p47phox e gp91phox.

Monócitos dos pacientes sépticos, no D0, apresentaram maior ativação da Nox2 (maior co-localização da gp91phox e da p47phox) comparados aos monócitos dos indivíduos saudáveis. Houve significativa diminuição da ativação da Nox2 nos monócitos dos pacientes sépticos no D7 (figura 22).

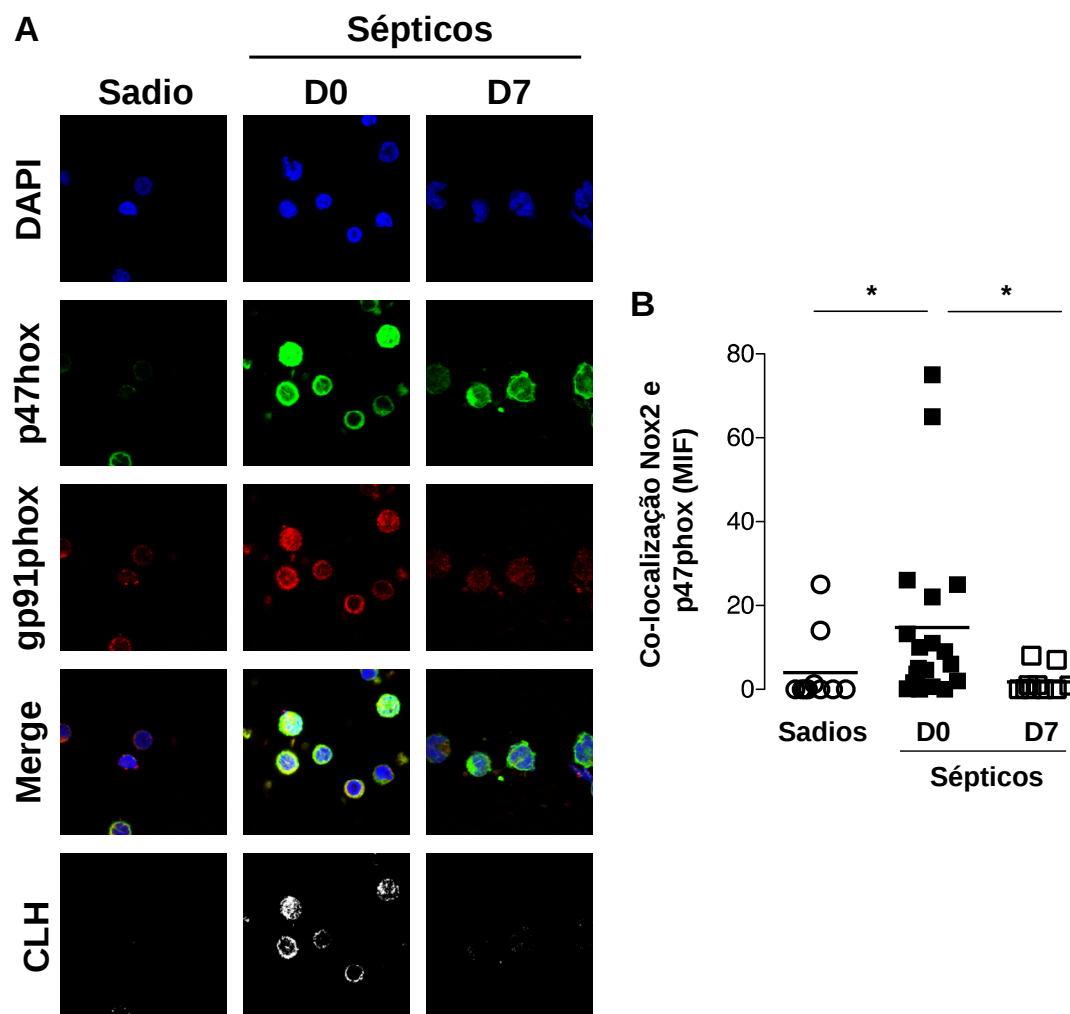


Figura 22: Co-localização da gp91phox (vermelho) e da p47phox (verde) (MIF) em PBMC de pacientes sépticos, obtidas no momento da internação, (D0; n=20), e após sete dias do diagnóstico (D7; n=10). PBMC purificadas de indivíduos saudáveis foram utilizadas como controles (n=10). (A) As imagens foram obtidas em microscópio confocal (aumento de 63X; ampliação de 5X). Os núcleos das células foram corados com 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI-azul). (B) O gráfico representa as médias de intensidade de fluorescência (MIF) obtidas pela análise de co-localização (*colocalization highlighter*) utilizando o programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA).

Discussão

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que monócitos de pacientes com sepse grave e choque séptico são modulados durante o processo de infecção, com aumento da fagocitose, geração de EROs e NO e diminuição da produção de citocinas inflamatórias. Estes achados confirmam, a nível celular, nossos resultados reportados anteriormente obtidos em monócitos de pacientes sépticos e apoiam ainda o conceito de "reprogramação" ou modulação de funções celulares em vez de hiporreatividade durante a sepse. (Salomao *et al.*, 2002; Brunialti *et al.*, 2006; Cavaillon e Adib-Conquy, 2006; Martins *et al.*, 2008; Salomao *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2012). Estes resultados também indicam semelhanças entre om a modulação em modelos de tolerância ao LPS e modulação de monócitos na sepse (Biswas e Lopez-Collazo, 2009; Del Fresno *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2010; Salomao *et al.*, 2012).

Estudos têm demonstrado que muitos mecanismos estão envolvidos no modelo de tolerância ao LPS, incluindo a presença de citocinas anti- inflamatórias circulantes, tais como IL-10 e TGF-beta; a excessiva regulação positiva da proteína de ligação ao LPS (LBP) ou CD14 solúvel; a sub-regulação dos receptores de LPS na superfície celular de células tolerantes; e a regulação negativa da sinalização dos receptores TLR (Dobrovolskaia e Vogel, 2002; Cavaillon e Adib-Conquy, 2006).

Foster *et al* relataram que mecanismos epigenéticos regulam a resposta ao LPS em células LPS-tolerantes. Eles encontraram dois grupos de genes diferencialmente regulados: (T) os genes "tolerizáveis" - genes que não foram reinduzidos ou foram induzidos em menor grau em macrófagos após um segundo desafio com LPS e os genes "não tolerizáveis" (NT), genes que foram rapidamente reinduzidos de forma eficiente, mesmo após o segundo desafio. Os genes de citocinas pró-inflamatórias apresentaram regulação negativa (T), enquanto genes antimicrobianos exibiram regulação positiva (NT), apoiando assim a hipótese de Foster et al de que a expressão de genes induzidos por receptores TLR com diferentes funções biológicas, são regulados de forma distinta (Foster *et al.*, 2007). Estes resultados foram estendidos para monócitos humanos por del Fresno e colaboradores, que encontraram a regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias e genes de apresentação de antígenos e o aumento da regulação dos fatores anti-inflamatórios, tais como a IRAK-M, e de efetores antimicrobianos (Del Fresno *et al.*, 2009).

Em estudo do nosso grupo que se concentrou na via de receptores de TLR sob desafio com LPS nós observamos regulação negativa de TNF- α , IL-12 e CCL2 e

regulação positiva de IL-10 e fatores estimuladores de colônia (CSF2 e CSF3) em células tolerantes (Mendes *et al.*, 2011). Assim, o fenômeno da tolerância em monócitos humanos engloba regulação positiva e negativa da atividade celular.

A regulação negativa das citocinas inflamatórias mediante a estimulação *in vitro* de monócitos ou células mononucleares do sangue periférico de pacientes sépticos foi consistentemente relatada na literatura (Munoz *et al.*, 1991; Ertel *et al.*, 1995; Rigato e Salomao, 2003). Nós somente observamos regulação positiva de citocinas inflamatórias em pacientes com infecção sem disfunção de órgãos (Brunialti *et al.*, 2006). Curiosamente, a modulação da resposta de monócitos durante a sepse ocorreu apesar de haver preservada ligação do LPS aos monócitos e preservação de expressão de TLR2 e TLR4 na superfície de monócitos (Salomao *et al.*, 2002; Brunialti *et al.*, 2006; Salomao *et al.*, 2008). A regulação da produção de IL-10 é mais controversa. Neste estudo, nós avaliamos o nível intracelular de IL-10 em monócitos de subgrupos de pacientes (N = 12) e voluntários saudáveis (N = 12) e não encontramos diferenças entre os voluntários saudáveis e pacientes sépticos; este achado é consistente com nossos resultados anteriores em sobrenadante de sangue total (Rigato e Salomao, 2003).

Os monócitos no sangue total apresentaram aumentos de geração de EROs e NO *in vitro* espontâneos e após estimulação com LPS e com bactérias gram-negativas e gram-positivas importantes clinicamente, *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Este resultado é consistente com nossos resultados obtidos anteriormente em duas outras coortes de pacientes sépticos (Martins *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2012). Para verificar se a produção de EROs era, pelo menos em parte, associada à fagocitose e ativação da NADPH-oxidase, avaliou-se a co-localização da p47phox e NOX-2 (gp91phox) em monócitos de pacientes sépticos. Como mostrado na Figura 7, observou-se co-localização em pacientes sépticos, principalmente nas amostras de admissão, o que não foi observado em voluntários saudáveis, indicando acoplamento do complexo NADPH-oxidase em pacientes sépticos. Embora este achado não exclua outra fonte de ROS, como, por exemplo, por parte das mitocôndrias, indica claramente que o aumento da atividade da NADPH-oxidase é uma fonte de EROs em pacientes sépticos. Em adição ao papel de EROs na defesa antimicrobiana, EROs está associado com toxicidade de células e órgãos na sepse e, consistente com achados anteriores (Martins *et al.*, 2003), observamos que a geração de EROs se correlaciona com o score de SOFA.

É interessante notar que nas amostras de acompanhamento, a diminuição da produção de EROs e aumento da produção de citocinas inflamatórias em comparação

com as amostras em admissão foram observados sob todos os estímulos, o que indica uma tendência para o restabelecimento da homeostase. Apoiando ainda a hipótese de modulação ao invés de hiporresponsividade em monócitos durante a sepse, observamos que a atividade fagocítica dos monócitos foi preservada durante o processo de infecção em curso, mesmo em pacientes com choque séptico. Este achado está de acordo com estudos anteriores de tolerância induzida por LPS *in vitro* (Del Fresno *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2010).

Além das semelhanças acima descritas com monócitos tolerantes ao LPS, o padrão da atividade de monócitos de pacientes sépticos neste estudo se assemelha ao descrito em macrófagos sob os efeitos de mediadores pro-resolução (resolvinas), que apresentam aumento da atividade fagocitária dos fagócitos sem evocar resposta pró-inflamatória (Chiang *et al.*, 2012).

Avaliamos ainda se as diferenças na modulação de citocinas inflamatórias e geração de EROs /NO observadas entre pacientes sépticos e voluntários saudáveis foram influenciadas pela expressão de CD163 em monócitos. Em geral, CD163⁺ monócitos produziram quantidades maiores de TNF- α e IL-6 e quantidades menores de ROS e NO do que os monócitos CD163⁻. Interação entre a expressão de CD163 e a produção de citocinas foi encontrada após estimulação com LPS ou bactérias, com os monócitos CD163⁺ produzindo maiores quantidades de citocinas do que os CD163⁻ tanto em pacientes quanto em voluntários saudáveis. Interação entre a expressão de CD163 e a produção de EROs também foi encontrada após estimulação *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Neste caso, as diferenças entre CD163⁺ e células CD163⁻ somente foram observados em pacientes sépticos; sob ambos os estímulos bacterianos, a geração de EROs foi maior em pacientes com sepse do que em voluntários saudáveis para os monócitos CD163⁺ e CD163⁻.

A detecção de níveis de citocinas inflamatórias mais elevados em células CD163⁺ do que em células CD163⁻ foi inesperada, devido ao papel anti-inflamatório de macrófagos alternativamente ativados (Mosser e Edwards, 2008; Gordon e Martinez, 2010). No entanto, este resultado é consistente com o conceito de que monócitos CD163⁺ teriam um papel duplo na sepse. CD163 pode ser importante para controlar a inflamação através da remoção da hemoglobina livre secundária a hemólise e conversão do heme para os seus metabolitos anti-inflamatórios, mas também pode funcionar como um sensor de bactéria (Etzerodt e Moestrup, 2013). Em concordância, Fabriek e colaboradores demonstraram a ligação de bactérias gram-positivas e gram-negativas a

molécula de CD163 e a indução de citocinas inflamatórias em células CHO que expressavam CD163 e supressão de citocinas induzidas por bactérias em monócitos humanos com o uso de anticorpos bloqueadores de CD163 (Fabriek *et al.*, 2009). Curiosamente, em pacientes sépticos, a produção de EROs foi menor em monócitos CD163+ do que em monócitos CD163-.

Em conclusão, demonstramos que monócitos de pacientes sépticos, que têm menor capacidade de produção de citocinas inflamatórias, exibem potente atividade fagocítica e aumento da geração de EROs e NO. Esta modulação representa um estado em que o indivíduo tenta controlar a resposta inflamatória sistêmica inicial, mantendo o controle sobre a infecção. Como sugerimos anteriormente, essa modulação pode representar o retorno à homeostase em casos de terapia antimicrobiana bem sucedida e recuperação da doença subjacente. Em contraste, nos pacientes que não conseguem montar uma resposta inflamatória robusta, esta modulação pode representar um estado de imunossupressão em pacientes com evolução prolongada (Santos *et al.*, 2012).

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Os resultados demonstrados no presente estudo corroboram a hipótese da existência de uma reprogramação celular na sepse que busca preservar a fagocitose, aumentar a capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e diminuir a produção de citocinas inflamatórias. Esta modulação por sua vez ocorre com o intuito de controlar a infecção e diminuir o dano da resposta inflamatória levando a uma recuperação da resposta imunológica.

Referências

7. REFERÊNCIAS

1. ANGUS, D. C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, v. 29, n. 7, p. 1303-10, Jul 2001.
2. ANGUS, D. C.; VAN DER POLL, T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, v. 369, n. 9, p. 840-51, Aug 29 2013.
3. BAUMGART, K.; RADERMACHER, P.; WAGNER, F. Applying gases for microcirculatory and cellular oxygenation in sepsis: effects of nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide. *Curr Opin Anaesthesiol*, v. 22, n. 2, p. 168-76, Apr 2009.
4. BENJAMIM, C. F. et al. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect Immun*, v. 70, n. 7, p. 3602-10, Jul 2002.
5. BISWAS, S. K. et al. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol Res*, v. 53, n. 1-3, p. 11-24, Sep 2012.
6. BISWAS, S. K.; LOPEZ-COLLAZO, E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*, v. 30, n. 10, p. 475-87, Oct 2009.
7. BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, v. 101, n. 6, p. 1644-55, Jun 1992.
8. BONE, R. C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med*, v. 24, n. 7, p. 1125-8, Jul 1996.
9. BROWN, K. A. et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet*, v. 368, n. 9530, p. 157-69, Jul 8 2006.
10. BRUNIALTI, M. K. et al. Increased percentages of T helper cells producing IL-17 and monocytes expressing markers of alternative activation in patients with sepsis. *PLoS One*, v. 7, n. 5, p. e37393, 2012.
11. BRUNIALTI, M. K. et al. TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Shock*, v. 25, n. 4, p. 351-7, Apr 2006.
12. CAVAILLON, J. M.; ADIB-CONQUY, M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care*, v. 10, n. 5, p. 233, 2006.
13. CEPINSKAS, G.; WILSON, J. X. Inflammatory response in microvascular endothelium in sepsis: role of oxidants. *J Clin Biochem Nutr*, v. 42, n. 3, p. 175-84, May 2008.
14. CHAUDHRY, H. et al. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo*, v. 27, n. 6, p. 669-84, Nov-Dec 2013.
15. CHIANG, N. et al. Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. *Nature*, v. 484, n. 7395, p. 524-8, Apr 26 2012.
16. DEL FRESNO, C. et al. Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J Immunol*, v. 182, n. 10, p. 6494-507, May 15 2009.
17. DEUTSCHMAN, C. S.; TRACEY, K. J. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity*, v. 40, n. 4, p. 463-75, Apr 17 2014.

18. DOBROVOLSKAIA, M. A.; VOGEL, S. N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect*, v. 4, n. 9, p. 903-14, Jul 2002.
19. ERTEL, W. et al. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood*, v. 85, n. 5, p. 1341-7, Mar 1 1995.
20. ETZERODT, A.; MOESTRUP, S. K. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxid Redox Signal*, v. 18, n. 17, p. 2352-63, Jun 10 2013.
21. FABRIEK, B. O. et al. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood*, v. 113, n. 4, p. 887-92, Jan 22 2009.
22. FERNANDES, M. L. et al. Human monocytes tolerant to LPS retain the ability to phagocytose bacteria and generate reactive oxygen species. *Braz J Med Biol Res*, v. 43, n. 9, p. 860-8, Sep 2010.
23. FOSTER, S. L.; HARGREAVES, D. C.; MEDZHITOV, R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*, v. 447, n. 7147, p. 972-8, Jun 21 2007.
24. GENTILE, L. F. et al. Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *J Trauma Acute Care Surg*, v. 72, n. 6, p. 1491-501, Jun 2012.
25. GOMES, N. E. et al. Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. *Braz J Med Biol Res*, v. 43, n. 9, p. 853-8, Sep 2010.
26. GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, v. 32, n. 5, p. 593-604, May 28 2010.
27. HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, v. 348, n. 2, p. 138-50, Jan 9 2003.
28. HOTCHKISS, R. S.; MONNERET, G.; PAYEN, D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*, v. 13, n. 3, p. 260-8, Mar 2013a.
29. KOJIMA, H. et al. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem*, v. 70, n. 13, p. 2446-53, Jul 1 1998.
30. LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*, v. 29, n. 4, p. 530-8, Apr 2003.
31. LOPEZ, A. et al. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med*, v. 32, n. 1, p. 21-30, Jan 2004.
32. MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, v. 25, n. 12, p. 677-86, Dec 2004.
33. MARTIN, G. S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, v. 348, n. 16, p. 1546-54, Apr 17 2003.
34. MARTINS, P. S. et al. Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis. *Crit Care*, v. 12, n. 1, p. R25, 2008.
35. MARTINS, P. S. et al. Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock*, v. 20, n. 3, p. 208-12, Sep 2003.

36. MENDES, M. E. et al. Differential expression of toll-like receptor signaling cascades in LPS-tolerant human peripheral blood mononuclear cells. *Immunobiology*, v. 216, n. 3, p. 285-95, Mar 2011.
37. MOLLER, H. J. et al. Macrophage serum markers in pneumococcal bacteremia: Prediction of survival by soluble CD163. *Crit Care Med*, v. 34, n. 10, p. 2561-6, Oct 2006.
38. MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, v. 8, n. 12, p. 958-69, Dec 2008.
39. MUNOZ, C. et al. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest*, v. 88, n. 5, p. 1747-54, Nov 1991.
40. PENA, O. M. et al. Endotoxin tolerance represents a distinctive state of alternative polarization (M2) in human mononuclear cells. *J Immunol*, v. 186, n. 12, p. 7243-54, Jun 15 2011.
41. RANGEL-FRAUSTO, M. S. et al. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA*, v. 273, n. 2, p. 117-23, Jan 11 1995.
42. REMICK, D. G. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol*, v. 170, n. 5, p. 1435-44, May 2007.
43. RIEDEMANN, N. C.; GUO, R. F.; WARD, P. A. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med*, v. 9, n. 5, p. 517-24, May 2003.
44. RIGATO, O.; SALOMAO, R. Impaired production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha but not of interleukin 10 in whole blood of patients with sepsis. *Shock*, v. 19, n. 2, p. 113-6, Feb 2003.
45. SALOMAO, R. et al. Bacterial sensing, cell signaling, and modulation of the immune response during sepsis. *Shock*, v. 38, n. 3, p. 227-42, Aug 2012.
46. SALOMAO, R. et al. Lipopolysaccharide-cell interaction and induced cellular activation in whole blood of septic patients. *J Endotoxin Res*, v. 8, n. 5, p. 371-9, 2002.
47. SALOMAO, R. et al. TLR signaling pathway in patients with sepsis. *Shock*, v. 30 Suppl 1, p. 73-7, Oct 2008.
48. SANTOS, S. S. et al. Generation of nitric oxide and reactive oxygen species by neutrophils and monocytes from septic patients and association with outcomes. *Shock*, v. 38, n. 1, p. 18-23, Jul 2012.
49. SCHULTE, W.; BERNHAGEN, J.; BUCALA, R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. *Mediators Inflamm*, v. 2013, p. 165974, 2013.
50. SILVA, E. et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care*, v. 8, n. 4, p. R251-60, Aug 2004.
51. STEIN, M. et al. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*, v. 176, n. 1, p. 287-92, Jul 1 1992.
52. SZABO, C. Poly(ADP-ribose) polymerase activation by reactive nitrogen species--relevance for the pathogenesis of inflammation. *Nitric Oxide*, v. 14, n. 2, p. 169-79, Mar 2006.
53. TANIGUCHI, L. U. et al. Sepsis-related deaths in Brazil: an analysis of the national mortality registry from 2002 to 2010. *Crit Care*, v. 18, n. 6, p. 608, 2014.
54. VANZANT, E. L. et al. Persistent inflammation, immunosuppression, and catabolism syndrome after severe blunt trauma. *J Trauma Acute Care Surg*, v. 76, n. 1, p. 21-9; discussion 29-30, Jan 2014.

55. XIAO, W. et al. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med*, v. 208, n. 13, p. 2581-90, Dec 19 2011.
56. ZHANG, X.; MORRISON, D. C. Lipopolysaccharide-induced selective priming effects on tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med*, v. 177, n. 2, p. 511-6, Feb 1 1993.
57. ZUGHAIER, S. M.; SHAFER, W. M.; STEPHENS, D. S. Antimicrobial peptides and endotoxin inhibit cytokine and nitric oxide release but amplify respiratory burst response in human and murine macrophages. *Cell Microbiol*, v. 7, n. 9, p. 1251-62, Sep 2005.

Appendice

Apêndice 1 – Aprovação do Comitê de ética em pesquisa – Hospital São Paulo

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP/ HOSPITAL SÃO PAULO	
--	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FUNCIONAL E FENOTÍPICO DE MONÓCITOS EM PACIENTES SÉPTICOS.

Pesquisador: Sidnéia Sousa Santos

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 16177413.5.0000.5505

Instituição Proponente: Escola Paulista de Medicina

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
FUND COORD DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 347.661

Data da Relatoria: 09/08/2013

Apresentação do Projeto:

Conforme Parecer do CEP no. 29677 DE 7/6/2013

Objetivo da Pesquisa:

Conforme Parecer do CEP no. 29677 DE 7/6/2013

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme Parecer do CEP no. 29677 DE 7/6/2013

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme Parecer do CEP no. 29677 DE 7/6/2013

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme Parecer do CEP no. 29677 DE 7/6/2013

Recomendações:

A coleta de amostras de pacientes do Hospital Israelita Albert Einstein e do Hospital Sírio Libanes deverá ser iniciada após aprovação do projeto pelo CEP local.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foi apresentada carta de aprovação do CEP do Hospital Santa Marcelina, e apresentado novo TCLE, o qual encontra-se adequado.

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14		
Bairro: VILA CLEMENTINO	CEP: 04.023-061	
UF: SP	Município: SÃO PAULO	
Telefone: (11)5539-7162	Fax: (11)5571-1062	E-mail: cepunifesp@unifesp.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 347.661

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

parecer acatado pelo colegiado

SAO PAULO, 02 de Agosto de 2013

Assinador por:

José Osmar Medina Pestana
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5539-7162

Fax: (11)5571-1062

E-mail: cepunifesp@unifesp.br

Apêndice 2 – Aprovação do Comitê de ética em pesquisa – Hospital Sírio Libanês

HOSPITAL SÍRIO LIBANÊS /
SOCIEDADE BENEFICENTE DE
SENHORAS

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Seps: integrando pesquisa básica e a investigação clínica II.

Pesquisador: Luciano Cesar Pontes de Azevedo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 02019012.1.2005.5461

Instituição Proponente: Sociedade Beneficente de Senhoras Hospital Sírio-Libanês

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 433.082-0

Data da Relatoria: 10/10/2013

Apresentação do Projeto:

Seps é um importante problema de saúde pública, com estimativa de 400.000 casos/ano no Brasil que acarretam cerca de 200.000 óbitos e custos de cerca de U\$ 20 bilhões anuais. De patogênese complexa, a morbi/mortalidade depende de fatores do microorganismo infectante, da resposta imune do hospedeiro e de intervenções terapêuticas adequadas. Nesse projeto pretendemos integrar investigação básica e clínica na seps, com foco na patogênese e desenvolvimento de estratégias de intervenção, educação e difusão de conhecimentos. Para lograr êxito na integração básica e clínica, manteremos a estrutura do temático anterior, baseado em três linhas de investigação: -clínica e epidemiológica: para avaliação multicêntrica de dados epidemiológicos e avaliação do impacto de intervenções; -interface clínico e experimental: para avaliação dos mecanismos de regulação celular durante a seps e estudo de fatores de patogenicidade dos microorganismos isolados dos pacientes; - estudos experimentais: para avaliação de mecanismos fisiopatológicos e de estratégias de intervenção terapêutica na seps. Essas linhas estão estruturadas em três eixos integrados de ação: 1-clínico-epidemiológico: constituímos rede de hospitais, que acompanharão prospectivamente pacientes com seps, com armazenamento de informações clínicas e epidemiológicas e coleta de amostras biológicas; 2-interface clínico e experimental: amostras biológicas provenientes de pacientes e controles obtidas da rede de hospitais serão transportadas e processadas em um laboratório central de imunologia e

Endereço: Rua Peixoto Gomide, 316 - 7º andar

Bairro: Jardim Paulista

CEP: 01.409-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3394-5701

E-mail: cepesq@hsl.org.br

HOSPITAL SÍRIO LIBANÊS /
SOCIEDADE BENEFICENTE DE
SENHORAS



Continuação do Parecer: 433.082-0

um

de microbiologia; 3- Pesquisa experimental: onde serão avaliadas novas hipóteses e potenciais alvos terapêuticos, empregando modelos de sepse (hiper e hipodinâmico), tendo como base as terapêuticas atualmente empregadas na clínica. As ações de integração e de difusão de conhecimento resultantes deste projeto incluem o fórum internacional de sepse e o programa de treinamento de hospitais na campanha sobrevivendo à sepse.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Este estudo tem como objetivo geral integrar investigação básica (pesquisa de laboratório) e clínica na sepse, com foco na patogênese, e desenvolvimento de estratégias de intervenção, educação e difusão de conhecimentos. Pretende-se ainda avaliar o perfil epidemiológico e o impacto das intervenções terapêuticas; avaliar os mecanismos de regulação celular durante a sepse e estudo de fatores de patogenidade dos microorganismos isolados dos pacientes; investigar os mecanismos fisiopatológicos na sepse e de estratégias de intervenção. 1. Avaliar e caracterizar a diferenciação de monócitos em populações de monócitos alternativamente ativados em pacientes sépticos (1a) e em modelos de tolerância ao LPS (1b). 2. Estudar o perfil de citocinas no sangue periférico de pacientes sépticos, considerando os perfis Th1, Th2, Treg e Th17. 3. Comparar os fatores de virulência e resistência antimicrobiana presentes em isolados clínicos de *S. aureus* provenientes de pacientes com sepse de etiologia comunitária versus aquela adquirida no ambiente hospitalar e a sua associação com a mortalidade dos pacientes acometidos por estes patógenos. 4. Identificação e Classificação da Dinâmica de Disfunção Microcirculatória na Sepse. 5. Estudo Terapêutico na Sepse Baseado na Disfunção Microcirculatória.

Objetivo Secundário: 1. Armazenar as amostras de *S. aureus* isoladas dos pacientes com sepse; 2. Determinar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos das amostras de *S. aureus*; 3. Detectar o principal gene de resistência bacteriana aos β -lactâmicos nas amostras de *S. aureus*; 4. Detectar os fatores de virulência nas amostras de *S. aureus*; 5. Análise comparativa dos mecanismos de resistência e dos fatores de virulência das amostras de *S. aureus* isoladas de acordo com o sítio primário de infecção e do seu modo de aquisição (hospitalar versus comunitária); 6. Descrever a associação dos fatores de virulência e dos mecanismos de resistência bacteriana presentes nas amostras de *S. aureus* à mortalidade dos pacientes com sepse. 7. Desenvolvimento de um método de classificação diagnóstica da disfunção microcirculatória

Endereço: Rua Peixoto Gomide, 316 - 7º andar

Bairro: Jardim Paulista

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3394-5701

CEP: 01.409-000

E-mail: cepesq@hsl.org.br

HOSPITAL SÍRIO LIBANÊS /
SOCIEDADE BENEFICENTE DE
SENHORAS



Continuação do Parecer: 433.082-0

(padrão de heterogeneidade da arquitetura tecidual) de órgãos, correspondente aos estágios clínicos progressivos da sepse (sepse, sepse grave e choque séptico).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos são mínimos e o único procedimento que pode acarretar algum desconforto ao participante é a coleta do sangue. A coleta é feita através de uma agulha fina que penetra em uma veia do braço. O desconforto pode ser pela dor local da picada (semelhante a de uma picada de formiga) e, raramente, pela formação de pequeno hematoma (roxeamento da pele). A coleta será realizada por profissionais experientes. O volume de sangue coletado não causa transtorno para o paciente. Pacientes que já estiverem com um acesso venoso (veia pega) não será necessário uma nova punção (picada) para a coleta do exame. Neste caso, será coletado sangue diretamente deste cateter. **Benefícios:** Não há benefício direto para o participante desse estudo. Porém, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar a compreender os mecanismos que causam a infecção, podendo assim abrir caminho para novos estudos sobre essa doença, como o organismo humano se defende e por vezes orientar o tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Protocolo relevante com critérios de inclusão/exclusão bem definidos. Protocolo adequado no ponto de vista ético e metodológico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentação apresentada de acordo com a legislação vigente, aprovada previamente pelo centro proponente. Atende às normas da Instituição.

Recomendações:

não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

presente projeto foi cadastrado no CEPesq como HSL 2013-55 e aprovado em 10-10-2013.

Segue abaixo lista de documentos aprovados:

- Protocolo versão agosto/2013;
- TCLE versão 1.0 de agosto/2013

Endereço: Rua Peixoto Gomide, 316 - 7º andar
Bairro: Jardim Paulista
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3394-5701

CEP: 01.409-000

E-mail: cepesq@hsl.org.br

HOSPITAL SÍRIO LIBANÊS /
SOCIEDADE BENEFICENTE DE
SENHORAS



Continuação do Parecer: 433.082-0

- TCLE voluntários sadios versão 1.0 de agosto/2013

Lembramos que o pesquisador deverá manter o CEPesq informado sobre o andamento de sua pesquisa através do envio de relatórios parciais (semestrais) e final, além de comunicar os eventos adversos e desvios de protocolo como preconiza a legislação vigente. De acordo com o cronograma apresentado, o primeiro relatório deverá ser apresentado em 10-04-2014.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 11 de Abril de 2014

Assinador por:
Alvaro Sadek Sarkis
(Coordenador)

Este parecer reemitido substitui o parecer número 433082 gerado na data 07/04/2014 22:11:26, onde o número CAAE foi alterado de 02019012.1.2002.5461 para 02019012.1.2005.5461.

Endereço: Rua Peixoto Gomide, 316 - 7º andar
Bairro: Jardim Paulista
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3394-5701

CEP: 01.409-000

E-mail: cepesq@hsl.org.br

Apêndice 3 – Aprovação do Comitê de ética em pesquisa – Hospital Israelita Albert Einstein – SP.

HOSPITAL ISRAELITA ALBERT
EINSTEIN-SP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Sepses -- Integrando a Pesquisa Básica e a Investigação Clínica II

Pesquisador: Murillo Santucci Cesar de Assunção

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 17455513.7.1001.0071

Instituição Proponente: Hospital Israelita Albert Einstein-SP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 374.686

Data da Relatoria: 27/08/2013

Apresentação do Projeto:

Trabalho multicêntrico no Brasil, bem desenhado, para estudar sepsis, uma das maiores causas de óbito em UTI. Vai haver um estudo em prontuário e mais exames incluindo estudos celulares a serem realizados na UNIFESP.

Objetivo da Pesquisa:

Definir melhor as múltiplas alterações da sepsis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há benefício algum ou risco para os pacientes. Há um grupo de voluntários no qual vai ser injetado LPD, e para este grupo será aplicado um outro Termo de Consentimento livre e Esclarecido, detalhando o desconforto por que irão passar.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa bem elaborada e importante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado o projeto de pesquisa, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Paciente, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Voluntário Sadio.

Recomendações:

Aprovar

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss

Bairro: Morumbi

CEP: 05.652-000

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2151-3729

Fax: (11)2151-0273

E-mail: cep@einstein.br

HOSPITAL ISRAELITA ALBERT
EINSTEIN-SP



Continuação do Parecer: 374.686

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovar os documentos apresentados.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein no cumprimento de suas atribuições, analisou e aprovou o projeto de pesquisa supracitado, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Paciente, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Voluntário Sadio, em reunião realizada em 27/08/2013.

SAO PAULO, 28 de Agosto de 2013

Assinador por:

Fabio Pires de Souza Santos
(Coordenador)

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss

Bairro: Morumbi

CEP: 05.652-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2151-3729

Fax: (11)2151-0273

E-mail: cep@einstein.br

Anexos

9. ANEXOS

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caracterização do perfil funcional e fenotípico de monócitos em pacientes sépticos

Pesquisadores responsáveis:

Sidnéia Sousa Santos

Reinaldo Salomão

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar do estudo: Avaliação da presença de diferentes perfis funcionais e fenotípicos de monócitos na sepse e sua associação com o estado de regulação na resposta inflamatória desses pacientes.

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

Os pacientes que morrem com infecção generalizada (sepse), na maioria das vezes apresentam falência de muitos órgãos, como os rins, pulmões, cérebro e coração, entre outros. Essa falência de órgãos é conhecida como disfunção de órgãos.

Existem várias células do corpo humano participando no processo de defesa frente a esses microorganismos invasores. Entre elas há os neutrófilos e os monócitos que são células do sistema imune inato, capazes de ingerir bactérias e eliminá-las da circulação, e os linfócitos que são células do sistema imune adaptativo, capazes de produzir uma resposta imune específica.

Durante a infecção existe uma adaptação celular que depende do estágio da infecção e que pode ocorrer de forma diferenciada nas diversas células do sangue. A população de linfócitos reguladores pode interferir no grau de resposta dos monócitos.

Basicamente, o objetivo desse estudo é:

Avaliar a presença de diferentes perfis tipos de monócitos na sepse e correlacionar com o estado de regulação na resposta inflamatória desses pacientes.

Coleta de sangue: será coletada amostra de 10mL de sangue em tubo a vácuo contendo heparina de 30 pacientes sépticos e vinte voluntários sadios. Serão incluídos prospectivamente pacientes com quadro clínico e laboratorial de sepse, sepse grave ou choque séptico, admitidos no Hospital São Paulo, Hospital Sírio Libanês, Hospital Albert Einstein e Hospital Santa Marcelina, na cidade de São Paulo. Os pacientes serão incluídos nas primeiras 72 horas do diagnóstico de sepse, ou nas primeiras 48 horas do evento definidor de sepse grave ou choque séptico. Os pacientes serão seguidos e serão colhidas outras amostras de sangue no sétimo dia após a primeira coleta ou alta hospitalar. Os voluntários sadios serão pareados por gênero e idade, que não estejam em uso de medicação e que participem espontaneamente do estudo, serão recrutados nos hospitais descritos acima ou via comunicação pessoal e a coleta do material será feita no Laboratório de Imunologia - DIPA.

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

raramente, pela formação de pequeno hematoma. A coleta será realizada por profissionais experientes.

Potenciais benefícios na participação deste estudo: Não há benefício direto para o participante desse estudo. Porém, os resultados desses exames poderão ajudar a compreender os mecanismos que causam a infecção, podendo assim abrir caminho para novos estudos sobre essa doença, como o organismo humano se defende e por vezes orientar o tratamento.

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

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas: Sidnéia Sousa Santos que pode ser encontrada no Laboratório de Imunologia, sito à Rua Pedro de Toledo, 669 – 10º andar, pelo telefone 5576-4855. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), Rua Botucatu, 572 - 1º andar cj 14. Fone: 5571-1062/Fone/Fax: 5539-7162.

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

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

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li, descrevendo o estudo: Avaliação da presença de diferentes perfis funcionais e fenotípicos de monócitos na sepse e sua associação com o estado de regulação na resposta inflamatória desses pacientes.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

paciente / representante legal
voluntário sadio

data ____/____/____

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

assinatura do pesquisador principal

data ____/____/____

Anexo 2 - Separação, contagem e congelamento de células mononucleares do sangue periférico

PROJETO: ESTUDO DE REGULAÇÃO CELULAR NA SEPSE.

Escrito por: Milena Karina Coló Brunialti

Aprovado por: Prof. Dr. Reinaldo Salomão

Revisado em: 22/09/2009

1. Utilizar sangue coletado em tubo vacutainer contendo heparina.
2. Antes de iniciar a separação de células separe um tubo para retirada do plasma, retire coloque o fluxo para esterilizar, retire o ficoll, o soro fisiológico e o a alíquota de RPMI da geladeira e o meio de congelamento do freezer -20°C. Verifique se há caixas "StrataCooler" suficientes pré-refrigeradas a 2-8°C.
3. Transferir sangue para um tubo de 50mL e diluir em parte igual com soro fisiológico. Homogeneizar.
4. Adicionar vagorosamente o sangue diluído a um tubo de 50mL contendo 15mL de ficoll-paque plus. Centrifugar a 2000rpm, 18°C por 20 minutos.
5. Coletar nuvem de células do tubo e transferir para outro tubo e completar com soro fisiológico. Acrescentar soro fisiológico até completar o volume para 50mL. Encaminhar o restante de amostra que ficou no tubo para separação de **células polimorfonucleares**.
6. Continuar apenas com PBMC. Centrifugar 2000rpm, 18°C por 10 minutos. Desprezar sobrenadante.
7. Repetir a lavagem no tubo com 50mL de soro fisiológico. Centrifugar. Desprezar sobrenadante.
8. Acrescentar 3mL de cloreto de amônio, homogeneizar e incubar 2 minutos. Acrescentar 10 mL de RPMI. Centrifugar. Desprezar sobrenadante.
9. Suspender botão de células em 10mL de meio RPMI.
10. Efetuar contagem de células em câmara de Neubauer: 10µL da suspensão de células + 90µL de corante *trypan blue* (diluição 1:10). Contar pelo menos dois quadrantes em diagonal. CÁLCULO: N° total de células = (N° de

células contadas) x (10.000/ N^o de quadrantes contados) x (diluição de células) x (volume da suspensão celular).

11. As células devem ser congeladas a aproximadamente 1×10^7 células/criotubo, até um máximo de 10 criotubos por amostra. Utilizando uma calculadora, divida o total de células contadas a ser congelado para cada indivíduo por 1×10^7 para determinar o número total de criotubos a serem utilizados. Se o primeiro número seguido do ponto decimal for 8 ou maior (X.8, X.9) arredonde para cima o número total de criotubos. Se o primeiro número seguido do ponto decimal for 7 ou menor (X.1, X.2, X.3, X.4, X.5, X.6, X.7) arredonde para baixo o número total de alíquotas a serem congeladas. Se houver mais do que 1×10^8 células (o bastante para mais que 10 criotubos), divida o número total de células por 10 para determinar quantas células serão colocadas em cada uma das 10 criotubos. No Apêndice 2, escreva o número de criotubos com células congeladas para cada indivíduo e o número de células por criotubo.
12. Centrifugar o tubo contendo as células durante 10 minutos a 2000rpm a 18° C. Enquanto as células estão centrifugando, coloque a marcação apropriada nos criotubos para cada amostra. A marcação deve incluir a correta identificação do indivíduo.
13. Inverter o tubo e descartar o sobrenadante. Bater no fundo de cada tubo para levantar o botão de células.
14. Suspende cada botão de células em meio de congelamento (soro fetal bovino 10% DMSO). Acrescentar 1mL por criotubo a ser congelado (determinado no passo 1 acima).
15. Transferir a suspensão de células para cada criotubo pre-marcado com 1mL/criotubo para cada indivíduo.
16. Colocar os criotubos na caixa "StrataCooler" que deve estar pré-refrigerada a 2-8°C.
17. Imediatamente coloque a caixa refrigerada contendo os criotubos em freezer -70°C por no mínimo 24h e no máximo 3 dias. Nunca coloque as células diretamente no nitrogênio.

18. Transferir os criotubos congelados para o botijão de nitrogênio tomando cuidado para não deixar as amostras descongelarem. No livro de controle do nitrogênio anotar aonde foram guardadas as amostras (haste, caixa e posição)

Soluções e Meio de Cultura

Meio de cultura RPMI 1640 pH=7,0

Meio RPMI 1640 autoclavável (Sigma)

10 IU/mL penicilina G (Invitrogen))

10 µg/mL estreptomicina sulfatada (Invitrogen)

200 mM L-glutamina (Invitrogen)

- Retirar da geladeira uma alíquota de RPMI em pó e dissolver em 900mL de água destilada ou milliQ.
- Acrescentar HCl 1N^A até pH=4,0 e acertar o volume final para 950mL.
- Distribuir igualmente, 240mL de meio de cultura em 4 garrafas de 500mL cada e autoclavar por 20 minutos.
- Deixar as garrafas contendo meio de cultura voltarem à temperatura ambiente. Pode-se armazenar em freezer -20°C ou seguir o preparo para uso final.
- Acrescentar cuidadosamente NaHCO₃^B estéril até pH=7,0.
- Acrescentar 2,56mL L-glutamina à 200mM que está armazenada em freezer -20°C.
- Acrescentar 250µL de penicilina/estreptomicina que está armazenada em freezer -20°C.
- Identificar com data de preparo e nome da pessoa que preparou.
- Guardar em geladeira.

A. Receita do HCl 1N: Acrescentar 8 mL de HCl concentrado em 92mL de água destilada.

B. Receita do NaHCO₃: Acrescentar 7,5g de NaHCO₃ em 100mL de água destilada e autoclavar. Guardar em geladeira.

Solução corante *trypan blue* 0,1%

- 50mL de PBS
- 0,05g de *trypan blue*
- Diluir o *trypan blue* no PBS e deixar descansar por 3 horas.
- Filtrar em papel de filtro
- Identificar com data de preparo e nome da pessoa que preparou.
- Guardar em geladeira.

Cloreto de Amônio pH 7,4 10x concentrado (solução estoque)

- 8,29 g de NH_4Cl
- 1,00 g de KHCO_3
- 0,0379g de Na_2EDTA
- Diluir em 100mL de água destilada e guardar em geladeira, identificar com a data, validade de um mês e nome da pessoa que preparou.

Solução de uso:

- o Diluir a solução estoque 1:10 em água destilada.
- o Filtrar com seringa e filtro 0,22. Identificar com a data, validade de um mês e nome da pessoa que preparou.
- o Guardar em geladeira.

Meio de Congelamento (FCS 10% DMSO)

- 45mL de soro fetal bovino (FCS - Invitrogen)
- 5mL de dimetilssulfóxido (DMSO)
- Acrescentar o DMSO ao FCS. Homogeneizar.
- Identificar com data de preparo e nome da pessoa que preparou.
- Guardar em freezer -20°C.

Anexo 3- Separação de Monócitos (Human Monocyte Enrichment Kit without CD16 depletion)

Escrito por: Alejandra Nucci

Revisto por: Sidnéia Sousa Santos

Aprovado por: Prof. Dra. Milena K C Brunialti

Revisado em: 01/04/2015

1. Retirar as amostras do nitrogênio líquido e colocar imediatamente em banho-maria a 37°C.
2. Retirar do banho-maria quando ainda houver um pedaço de gelo visível no criotubo.
3. Em fluxo laminar estéril, transferir o conteúdo para um tubo de 15mL.
4. Gotejar 10mL de meio R10 dentro do tubo de 15mL contendo a amostra (Usar 1mL para lavar o criotubo e gotejar 9mL).
5. Homogeneizar por inversão. Centrifugar 400g por 10min a temperatura ambiente.
6. Descartar o sobrenadante, homogeneizar batendo no fundo do tubo.
7. Acrescentar 5mL de meio RPMI e realizar contagem das células.
 - 10uL de trypan + 10uL de amostra
8. Realizar contas para acertar a concentração de células.
9. Retirar uma alíquota de 3×10^5 cel para Imunofenotipagem (não se esquecer de descontar esse volume retirado do volume total para acerto da concentração final que deve ser de 5×10^7 cel/mL).
10. Centrifugar o restante da suspensão de células a 400g por 10min a temperatura ambiente.
11. Descartar o sobrenadante.

12. Acrescentar 1mL de **meio Stem Cell**, homogeneizar cuidadosamente com com pipeta e transferir o conteúdo para tubo poliestireno que caberá corretamente no magneto EasySep™.
13. Repetir o passo 12 de maneira que o volume final que conteráno tubo de poliestireno será 2mL que com as células de interesse.
14. Centrifugar 400g por 10min a temperatura ambiente.
15. Retirar o sobrenadante cuidadosamente com uma micropipeta.
16. Não homogeneizar.
17. Suspender o pellet na concentração de 5×10^7 cel/mL em meio Stem Cell.
18. Acrescentar 50µL de pool de anticorpos para cada 1mL de suspensão.
19. Incubar 10 min a 2-8° C.
20. Homogeneizar o tubo das partículas magnéticas em vortex por 30 segundos.
21. Acrescentar a solução de partículas magnéticas na mesma quantidade do pool de anticorpos.
22. Incubar 5 min de 2-8° C.
23. Acrescentar meio Stem Cell para que o volume final chegue a 2,5mL (2,5mL – o volume que foi usado para suspender as células a uma concentração de 5×10^7 cel/mL).
24. Colocar o tubo de amostra dentro do magneto sem a tampa por 2,5 min a temperatura ambiente.
25. Com o tubo ainda dentro do magneto, inverter com cuidado e colocar o eluente em um novo tubo. Não agitar e não bater! Não retirar a última gota que ficar na boca do tubo!
26. Repetir o passo 25 utilizando o tubo do eluente.
27. Esta suspensão será rica em monócitos.
28. Retirar uma alíquota de 3×10^5 cel para Imunofenotipagem.
29. Realizar imunofenotipagem das duas amostras aliquoteadas.

Imunofenotipagem

1. Centrifugar as alíquotas separadas para Imunofenotipagem a 400g por 5min a temperatura ambiente.
2. Descartar o sobrenadante e secar bem o tubo.
3. Realizar marcação de superfície com **6µL de CD14-PerCP**.
2. Incubar 15 min no escuro em temperatura ambiente.
3. Acrescentar 2mL de **meio Stem Cell**.
4. Centrifugar 400g por 5min a temperatura ambiente.
5. Descartar o sobrenadante e homogeneizar o botão batendo o fundo do tubo.
6. Acrescentar 300uL de **meio Stem Cell**.
7. Realizar aquisição em citômetro de fluxo. Adquirir 5000 eventos na combinação de tamanho e complexidade e positividade para CD14. Todos os eventos salvos.

Meio Stem Cell:

Para 100mL:

-EDTA...37,22mg

-FCS.....2mL

-PBS....98mL

Anexo 4 – Manuscrito enviado para Intensive Care Medicine Experimental**Title page**

Modulation of monocytes in septic patients: preserved phagocytic activity, increased ROS and NO generation and decreased production of inflammatory cytokines

Short running title: Modulation of monocytes' functions in sepsis

Sidnéia S. Santos¹, Amanda M. do Carmo¹, Milena K. C. Brunialti¹, Flavia R. Machado¹, Luciano C. P. de Azevedo², Murillo Assunção³, Sílvia C. Trevelin⁴, Fernando Q. Cunha⁴, Reinaldo Salomao¹.

(1) Escola Paulista de Medicina, Hospital São Paulo, Universidade Federal de São Paulo; (2) Hospital Sírio Libanes; (3) Hospital Israelita Albert Einstein; (4) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto.

Abstract

Purpose The nature of the inflammatory response underscoring the pathophysiology of sepsis has been extensively studied. We hypothesized that different cell functions would be differentially regulated in a patient with sepsis. We evaluated the modulation of monocyte functions during sepsis by simultaneously assessing their phagocytic activity, the generation of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the production of inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α). **Methods** Whole blood was obtained from septic patients both at admission (D0, n=34) and after seven days of therapy (D7, n=15); 19 healthy volunteers were included as a control group. The cells were stimulated with LPS, *P. aeruginosa*, and *S. aureus*. The ROS and NO levels were quantified in monocytes in whole blood by measuring the oxidation of 2,7-dichlorofluorescein diacetate and 4-amino-5-methylamino-2,7-difluorofluorescein diacetate, respectively. Intracellular IL-6 and TNF- α were detected using fluorochrome-conjugated specific antibodies. Monocyte functions were also evaluated in CD163⁺ and CD163⁻ monocyte subsets. **Results** The monocytes from septic patients presented with preserved phagocytosis, enhanced ROS and NO generation, and decreased production of inflammatory cytokines compared with the monocytes from healthy volunteers. TNF- α and IL-6 increased and ROS generation decreased in D7 compared with D0 samples. In general, CD163⁺ monocytes produced higher amounts of IL-6 and TNF- α and lower amounts of ROS and NO than did CD163⁻ monocytes. **Conclusions** We demonstrated that monocytes from septic patients, which are impaired to produce inflammatory cytokines, display potent phagocytic activity and increased ROS and NO generation. **Keywords:** Monocytes; Reactive oxygen species; Nitric oxide; IL-6; TNF- α ; Phagocytosis.

Introduction

Sepsis has been defined as a systemic inflammatory response (SIRS) triggered by an ongoing infection [1], and more recently considered as the host's deleterious, non-resolving inflammatory response to infection that leads to organ dysfunction [2]. Understanding the nature of how the inflammatory response underscores the pathophysiology of sepsis would not only help clarify the mechanisms of the syndrome but would also lead to the identification of new therapeutic targets.

Currently, it is generally accepted that infection triggers both inflammatory and anti-inflammatory responses. Accordingly, two major mechanisms have been proposed for the injuries caused by sepsis: sustained activation of innate immunity leading to inflammation and injury [3] and a predominant initial hyperinflammatory phase followed by impaired immunity and an anti-inflammatory state [4].

One issue with this model is that the innate immune cells would be regulated in their global functions, and monocytes and neutrophils, for example, are thought to be suppressed in all of their activities in protracted septic patients [4]. In fact, most studies that evaluated blood cells from septic patients have demonstrated an impaired production of inflammatory cytokines after in vitro stimulation, [4, 5] whereas neutrophils have been shown to have both up- and down regulated functions [6]. Interestingly, we observed that peripheral mononuclear cells(PBMC) [7, 8] and monocytes[9] from septic patients, which were unable to produce inflammatory cytokines, showed an upregulation of ROS generation [10], which was confirmed in another cohort of patients in whom the up regulation of NO generation was also observed [11]. These findings indicate that both a hyperresponse and a hyporesponse can occur, depending on the functions and cells evaluated and, importantly, on the ongoing sepsis process [12, 13].

Reprogramming of monocyte functions was first proposed in an LPS-tolerance model where, depending on the preconditioning treatment, LPS induced selective priming effects on the production of TNF- α and NO in mouse peritoneal macrophages [14]. Subsequent studies demonstrated that LPS-tolerant cells do not produce inflammatory cytokines but present potent phagocytic activity and retain the ability to generate ROS [9, 15, 16]. The alternatively activated macrophages (AAM) also produce reduced levels of inflammatory cytokines and exhibited regulatory or repair activity [17]. These cells exhibited an increased expression of CD206 (mannose receptor) and CD163 (hemoglobin-haptoglobin receptor) [18] receptors, which have also been shown to have increased expression in septic patients [19, 20].

We hypothesized that different cell functions would be differentially regulated in a patient with sepsis. Thus, we evaluated monocyte modulation during sepsis by simultaneously assessing their phagocytic activity, the generation of ROS and NO, and the production of inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α). Furthermore, these activities were assessed in the subsets of cells with or without CD163 expression.

Methods

Patients and healthy volunteers

Patients admitted to the Intensive Care Units of the Sao Paulo, Albert Einstein, and Sirio-Libanes Hospitals with a clinical diagnosis of sepsis according to the ACCP/SCCM consensus conference[1], from April 2014 to June 2015, were enrolled in the study. The protocol was approved by the ethics committees of the participating hospitals.

Blood samples were obtained from 34 septic patients at admission (D0), and 15 of the patients had a second sample collected after 7 days (D7) of therapy. Samples were also collected from 19 healthy volunteers who were matched according to age and gender.

LPS, gram-negative and gram-positive bacteria

LPS from *Salmonella abortus equi* was a generous gift from C. Galanos (Max-Planck Institute of Immunobiology, Germany). *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) and *S. aureus* (ATCC 25923) were purchased from Oxoid Limited, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom.

Induction and detection of the production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) in monocytes in whole blood

ROS and NO were measured constitutively and after stimulation with LPS and heat-killed *S. aureus*, and *P. aeruginosa* for 30 min. Based on the dose-response curves, 100 ng/mL LPS, and 2.4×10^8 colonies/mL *S. aureus*, and *P. aeruginosa* were used for ROS and NO induction. The ROS and NO levels were quantified in monocytes in whole blood by measuring the oxidation of 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA; Sigma, St. Louis, MO) and 4-amino-5-methylamino-2,7-difluorofluorescein diacetate (DAF-FMDA; Invitrogen, Carlsbad, CA), respectively, as previously described [11, 21].

Intracellular detection of cytokines in monocytes in whole blood

Whole blood was diluted 1:2 in RPMI and incubated with LPS and heat-killed bacteria (LPS: 100 ng/mL, *P. aeruginosa*: 2.4×10^8 /mL and *S. aureus*: 2.4×10^8 /mL), or without stimulus in 5-mL propylene tubes at 37°C in the presence of 5% CO₂. After 30 min, 5

μL (1 mg/mL) of Brefeldin A (Sigma, Saint Louis, MO, USA) was added to the samples, and they were incubated for an additional 4 hr. Intracellular cytokines were detected using fluorochrome-conjugated specific antibodies (anti-IL-6-APC clone MQ2-13A5 and anti-TNF-PE-Cy7 clone Mab11 (BD Bioscience)) as previously described [15].

Phagocytosis of monocytes in whole blood

Phagocytosis of monocytes was measured using *E. coli* conjugated to FITC (PhagotestTM, Glycotope Bbiotechnology, Heidelberg, Germany), accordingly to the manufacturer instructions.

Flow cytometry

Detection of phagocytosis and the production of ROS, NO, IL-6 and TNF-α by monocytes in whole blood was performed by multiparameter flow cytometry (LSRFORTESSA (BD Bioscience)). Events acquisition was performed using FACSDiva software (BD Bioscience) and the analyses were performed using FlowJo (Tree Star INC. Ashland, OR, USA).

Detection of the production of ROS, NO, IL-6 and TNF-α

Monocyte analysis was performed by assessing individual cells (singlets) combined with side-scatter parameters versus CD14-positiveness. Monocytes were further characterized as CD163 positive or negative cells. The quadrant for CD163+ cells was established based on isotype control. The productions of ROS and NO were quantified by the geometric mean fluorescence intensity (MGIF) associated with the detection of

DCFH and DAF, respectively (Figure 1). Intracellular cytokine levels are expressed as the percentage of cytokine-producing monocytes (Figure 2).

Co-location of gp91phox and p47phox by immunofluorescence

PBMCs were obtained using the Ficoll density gradient method (Ficoll-Paque PLUS; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) and stored in liquid nitrogen until use. After defrosting, the cells were spun on glass slides. The cells were incubated overnight with the primary antibodies goat anti-Nox2 (1:200) and rabbit anti-p47 (1:100) and then incubated with red fluorescent Alexa Fluor 594 (donkey anti-goat; 1:400), and/or green fluorescent Alexa Fluor 488 (donkey anti-rabbit; 1:200). Nuclear material was stained with 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich, USA). Images of stained cells were captured using a confocal microscope SP5 (Leica, EUA). The images were analyzed in the program Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA) using the plugin colocalizationanalysis/colocalization highlighter (colocalized points- 8 bit). That tool generated a new image that presented the points of co-localization of p47phox and gp91phox. Those points of co-localization were quantified from the average fluorescence intensity corresponding to two to four cells / randomly selected field.

Statistical analyses

The results were analyzed using SPSS (Statistical Package for Social Sciences v 19.0) (IBM, Armonk, NY, EUA). The Shapiro-Wilk test was applied to determine the normality of the results. Comparisons between healthy volunteers and patients were performed using the Mann-Whitney U test, and comparisons between patient samples (D7 vs. D0) were performed using the Wilcoxon test.

The interactions of CD163 with ROS, NO, IL-6 and TNF levels were analyzed by 2-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) with the Bonferroni posttest. *P* values ≤ 0.05 were considered significant.

Results

Patient demographic and clinical data

Of the 34 patients enrolled in this study, 55.9% had severe sepsis, and 44.1% had septic shock. The mean age of the patients was 62.4 years, ranging from 25 to 92 years, and 52.9% were male. The primary sources of infection were the respiratory tract (47.1%), abdomen (20.6%), urinary tract (23.5%), and others (3%). The mean Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score was 5.47 and ranged from 0 to 16. The in-hospital mortality was 11.8%. The mean age of the healthy volunteers was 59.9 years, ranging from 30 to 88 years, and 52.6% were male.

Phagocytosis, ROS and NO production, and intracellular detection of cytokines in monocytes in whole blood

No differences were found in monocyte phagocytosis of opsonized *E. coli* between healthy volunteers (median, GMFI, 15.499; range 8.722-24.879) and septic patients at D0 (median, GMFI, 19.707; range 5.207-35.075) ($P=0.178$).

ROS and NO generation were higher in septic patients than in healthy volunteers in all conditions tested (Table). In contrast, the percentages of monocytes producing TNF- α and IL-6 were lower in septic patients than in healthy volunteers following LPS, *P. aeruginosa*, and *S. aureus* stimulation (Table).

No differences were found in *E. coli* phagocytosis when patients were classified as having severe sepsis or septic shock: volunteers (median, GMFI, 15.499; range 8.722-24.879), severe sepsis (median, GMFI, 23.733; range 6.118-35.075) and septic shock (median, GMFI, 17.116; range 5.207-32.877) ($P=0.112$).

ROS and NO generation differed when healthy volunteers, severe sepsis patients and septic shock patients were compared in all conditions tested ($P<0.001$, Kruskal Wallis) (Figure 3a and b). The pairwise comparison (Mann-Whitney) showed that patients with severe sepsis and septic shock had higher ROS and NO generation than did healthy volunteers in all conditions tested (Figure 3a and b). ROS generation was higher in septic shock patients than in sepsis patients in unstimulated cells and after LPS, and *P. aeruginosa* stimulation (Figure 3a), whereas no differences were found in NO production between patients with severe sepsis and septic shock (Figure 3b).

The percentages of monocytes producing IL-6 was lower in severe sepsis and septic shock patients than in healthy volunteers following LPS, *P. aeruginosa* and *S. aureus* stimulation ($P<0.05$, Kruskal Wallis); no differences were found between patients with severe sepsis and septic shock (Figure 3c).

Similarly, TNF- α production differed among healthy volunteers, severe sepsis patients and septic shock patients in all conditions tested ($P<0.05$, Kruskal Wallis). In this case, differences were found in the septic group, with lower detection in patients with septic shock than in those with severe sepsis for all stimuli tested (Figure 3d).

ROS generation was positively correlated with SOFA score in all conditions tested (Figure 4), whereas no correlations were found between the organ dysfunction score and any other cell functions evaluated in any of the conditions tested: NO (Control: $P=0.106$; LPS: $P=0.112$; *P. aeruginosa* $P=0.192$, and *S. aureus*: $P=0.196$), TNF- α

(LPS: $P=0.272$; *P. aeruginosa* $P=0.132$, and *S. aureus*: $P=0.303$) and IL-6 (LPS: $P=0.641$; *P. aeruginosa* $P=0.598$, and *S. aureus*: $P=0.606$) (Pearson correlation test).

Interaction between monocyte functions and cell surface expression of CD163

We assessed whether the differences in the modulation of the generation of ROS, NO IL-6, and TNF- α observed between septic patients and healthy volunteers were influenced by CD163 expression on the surfaces of monocytes. CD163 expression was found to be associated with IL-6 production after stimulation with LPS and *S. aureus*, and with TNF- α production after stimulation with LPS, *P. aeruginosa*, and *S. aureus* (Figure 5). In all conditions, CD163⁺ monocytes produced higher amounts of cytokines than CD163⁻ monocytes in both septic patients and healthy subjects ($P<0.05$). The levels of TNF- α and IL-6 were higher in healthy volunteers than in septic patients in both CD163⁺ and CD163⁻ monocytes ($P<0.05$) in all tested conditions, except for CD163⁻ monocytes after stimulation with *S. aureus* ($P=0.958$). An interaction was also found between CD163 expression and ROS generation after stimulation with *S. aureus* and *P. aeruginosa*. The difference in ROS generation between CD163⁻ and CD163⁺ cells was only observed in septic patients, with CD163⁻ cells producing higher amounts of ROS ($P<0.001$). ROS generation was higher in septic patients than in healthy volunteers following *S. aureus* and *P. aeruginosa* stimulation in both CD163⁻ and CD163⁺ monocytes ($P<0.001$). Finally, an interaction between CD163 expression and NO generation was found after LPS stimulation, with the highest values observed in CD163⁻ cells (Figure 5).

Dynamics of monocyte functions in patient follow-up samples

There was no difference in the phagocytic activity of monocytes from septic patients at admission (D0) (Median, GMFI, 19.473; range 5.207-35.075) and after seven days of follow-up (Median, GMFI, 18.887; range 6.023-31.803) ($P=0.875$).

ROS generation was lower at D7 than at D0 in all conditions tested (Figure 6). A similar trend was seen for NO generation, but a significant change was only observed after *P. aeruginosa* stimulation (Figure 6). In contrast, increased levels of IL-6 and TNF- α were found at D7 compared with those observed at D0 following LPS, *P. aeruginosa*, and *S. aureus* stimulation (Figure 6).

Co-location of gp91phox and p47phox by immunofluorescence

At D0, monocytes from septic patients presented with higher Nox2 activation, as assessed by co-location of gp91phox and p47phox, than did monocytes from healthy volunteers. A significant decrease in Nox2 activation was observed after seven days of follow-up (D7) ($P<0.05$) (Figure 7).

Discussion

Our results show that monocytes from septic patients are modulated during the ongoing infection process, with preserved phagocytosis, increased ROS and NO generation, and decreased production of inflammatory cytokines. These results are consistent with our previously reported findings obtained in monocytes from septic patients [7, 9-11] and further support the concept of “reprogramming”, or modulation of cell functions rather than hyporesponsiveness during sepsis [12, 22].

These results also indicate the similarities between monocyte modulation in LPS-tolerance models and monocyte modulation in sepsis [12, 15, 16]. Multiple mechanisms have been shown to be involved in tolerance to LPS. Foster et al reported the epigenetic mechanisms driving the modulation of LPS-response in LPS-tolerant cells. They found two groups of differentially regulated genes: the “tolerizeable” (T) and the “nontolerizeable” (NT) genes. The proinflammatory cytokine genes were found to be down-regulated (T), whereas antimicrobial genes were found to be up-regulated (NT), thus supporting their hypothesis that TLR-induced gene expression with different biological functions is distinctly regulated [23]. These findings were extended to human monocytes by Del Fresno and coworkers, who found down-regulation of pro-inflammatory cytokines and antigen presentation genes and up-regulation of anti-inflammatory factors, such as IRAK-M, and antimicrobial effectors [16]. In our own study, which focused on the TLR-pathway, we observed down-regulation of TNF- α , IL-12 and CCL2 and up-regulation of IL-10 and colony stimulating factors (CSF2 and CSF3) in tolerant cells [24].

Down-regulation of inflammatory cytokines, measured at intracellular level in our study, has been consistently reported in the literature upon the *in vitro* stimulation of monocytes from septic patients [8, 25, 26]. Modulation of the monocyte response during sepsis occurred despite preservation of LPS-binding to monocytes and of TLR2 and TLR4 expression on the monocyte cell surface [7, 9, 13]. The regulation of IL-10 production is more controversial. In this study, we found no differences in intracellular levels of IL-10 in monocytes in a subset of patients (N=12) and healthy volunteers (N=12) (data not shown); this finding is consistent with our previous results in whole blood supernatants [8].

Monocytes in whole blood presented increases in ROS and NO generation *in vitro* after stimulation with LPS, and gram-negative and gram-positive clinically significant bacteria, *P. aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, respectively. This finding is consistent with our previously reported results in two other series of septic patients [10, 11]. To further link ROS generation to phagocytosis, we evaluated the co-localization of p47^{phox} and NOX-2 (gp91^{phox}) in monocytes of septic patients. Co-localization was found in septic patients, mainly in the admission samples, and not in healthy volunteers, indicating that increased NADPH-oxidase activity is a source of ROS in septic patients. In addition to the role of ROS in antimicrobial defense, ROS is associated with cell and organ toxicity in sepsis. Consistent with previous findings [10], we found that ROS generation correlated with the SOFA score.

In the follow-up samples, decreased production of ROS and increased production of inflammatory cytokines were observed under all stimuli compared to in the admission samples, which indicated a trend toward the restoration of homeostasis.

In further support of modulation rather than hyporesponse in monocytes during sepsis, we found that the phagocytic activity of monocytes was preserved during the ongoing

infection process, even in patients with septic shock. This finding is in agreement with previous studies of LPS-induced tolerance in vitro [15, 16].

In addition to the above described similarities with LPS-tolerant monocytes, the pattern of activities of monocytes from septic patients in this study resembles that described for macrophages under the effects of pro-resolving mediators, which present enhanced phagocytic activity without evoking pro-inflammatory responses [27].

We evaluated whether the differences in the modulation of inflammatory cytokines and ROS/NO generation observed between septic patients and healthy volunteers were influenced by the expression of CD163 on monocytes. In general, CD163⁺ monocytes produced higher amounts of TNF- α and IL-6 and lower amounts of ROS and NO than did CD163⁻ monocytes. An interaction between the expression of CD163 with cytokine production was found upon stimulation with LPS or bacteria, with CD163⁺ monocytes producing higher amounts of cytokines in both patients and healthy volunteers. An interaction between the expression of CD163 and ROS generation was also found after *S. aureus* and *P. aeruginosa* stimulation. In this case, differences between CD163⁺ and CD163⁻ cells were only observed in septic patients; under both bacterial stimuli, ROS generation was higher in sepsis patients than in healthy volunteers for both CD163⁺ and CD163⁻ monocytes.

Detection of higher levels of inflammatory cytokines in CD163⁺ cells than in CD163⁻ cells was unexpected because of the anti-inflammatory role of alternatively activated macrophages [17]. However, this finding is consistent with the concept of a dual role of CD163⁺ monocytes in sepsis. CD163 may be important for controlling inflammation by removing free hemoglobin secondary to hemolysis and converting heme to its anti-inflammatory metabolites, but it also may function as a sensor of bacteria [28].

Accordingly, Fabrick and coworkers demonstrated the binding of gram-positive and gram-negative bacteria to CD163 and induction of inflammatory cytokines in CD163-expressing CHO cells and suppression of bacteria-induced cytokines in human monocytes by blocking antibodies against CD163 [29]. Supporting our results with septic patients, we observed that modulation of cytokines production in a model of LPS tolerance occurred regardless of the expression of CD163 on monocytes cell surface [30].

In conclusion, we demonstrated that monocytes from septic patients, which have impaired inflammatory cytokine production, display potent phagocytic activity and increased ROS and NO generation. This modulation represents a state in which the host attempts to control the initial systemic inflammatory response while maintaining control over infection. As we previously suggested, this modulation may represent the return to homeostasis in cases of successful antimicrobial therapy and recovery of underlying disease. In contrast, failure to mount a robust inflammatory response may represent a state of immunosuppression in protracted patients [12].

Acknowledgements

We are in debt to Renato Arruda Mortara for contribution on confocal microscopy, to Ana Cristina Gales for providing the bacteria used for monocyte stimulation and to Gianni Santos for statistic support. This work was supported by Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP) – Grant number 2011/20401-4 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnologico – CNPq – Grant number 305685/2011-2. S. S. Santos has a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Disclosure of Conflicts of Interest

The authors have no conflicts of interest.

References

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ, (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101: 1644-1655
2. Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ, (2013) Sepsis definitions: time for change. *Lancet* 381: 774-775
3. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, Hayden DL, Hennessy L, Moore EE, Minei JP, Bankey PE, Johnson JL, Sperry J, Nathens AB, Billiar TR, West MA, Brownstein BH, Mason PH, Baker HV, Finnerty CC, Jeschke MG, Lopez MC, Klein MB, Gamelli RL, Gibran NS, Arnoldo B, Xu W, Zhang Y, Calvano SE, McDonald-Smith GP, Schoenfeld DA, Storey JD, Cobb JP, Warren HS, Moldawer LL, Herndon DN, Lowry SF, Maier RV, Davis RW, Tompkins RG, (2011) A genomic storm in critically injured humans. *The Journal of experimental medicine* 208: 2581-2590
4. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D, (2013) Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *The Lancet Infectious diseases* 13: 260-268
5. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA, (2003) Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nature medicine* 9: 517-524
6. Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF, (2006) Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* 368: 157-169
7. Brunialti MK, Martins PS, Barbosa de Carvalho H, Machado FR, Barbosa LM, Salomao R, (2006) TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Shock* 25: 351-357
8. Rigato O, Salomao R, (2003) Impaired production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha but not of interleukin 10 in whole blood of patients with sepsis. *Shock* 19: 113-116
9. Salomao R, Brunialti MK, Kallas EG, Martins PS, Rigato O, Freudenberg M, (2002) Lipopolysaccharide-cell interaction and induced cellular activation in whole blood of septic patients. *Journal of endotoxin research* 8: 371-379
10. Martins PS, Brunialti MK, Martos LS, Machado FR, Assuncao MS, Blecher S, Salomao R, (2008) Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis. *Crit Care* 12: R25
11. Santos SS, Brunialti MK, Rigato O, Machado FR, Silva E, Salomao R, (2012) Generation of nitric oxide and reactive oxygen species by neutrophils and monocytes from septic patients and association with outcomes. *Shock* 38: 18-23
12. Salomao R, Brunialti MK, Rapozo MM, Baggio-Zappia GL, Galanos C, Freudenberg M, (2012) Bacterial sensing, cell signaling, and modulation of the immune response during sepsis. *Shock* 38: 227-242
13. Salomao R, Martins PS, Brunialti MK, Fernandes Mda L, Martos LS, Mendes ME, Gomes NE, Rigato O, (2008) TLR signaling pathway in patients with sepsis. *Shock* 30 Suppl 1: 73-77

14. Zhang X, Morrison DC, (1993) Lipopolysaccharide-induced selective priming effects on tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. *The Journal of experimental medicine* 177: 511-516
15. Fernandes ML, Mendes ME, Brunialti MK, Salomao R, (2010) Human monocytes tolerant to LPS retain the ability to phagocytose bacteria and generate reactive oxygen species. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 43: 860-868
16. del Fresno C, Garcia-Rio F, Gomez-Pina V, Soares-Schanoski A, Fernandez-Ruiz I, Jurado T, Kajiji T, Shu C, Marin E, Gutierrez del Arroyo A, Prados C, Arnalich F, Fuentes-Prior P, Biswas SK, Lopez-Collazo E, (2009) Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J Immunol* 182: 6494-6507
17. Mosser DM, Edwards JP, (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology* 8: 958-969
18. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M, (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25: 677-686
19. Brunialti MK, Santos MC, Rigato O, Machado FR, Silva E, Salomao R, (2012) Increased percentages of T helper cells producing IL-17 and monocytes expressing markers of alternative activation in patients with sepsis. *PloS one* 7: e37393
20. Moller HJ, Moestrup SK, Weis N, Wejse C, Nielsen H, Pedersen SS, Attermann J, Nexø E, Kronborg G, (2006) Macrophage serum markers in pneumococcal bacteremia: Prediction of survival by soluble CD163. *Critical care medicine* 34: 2561-2566
21. Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T, (1998) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Analytical chemistry* 70: 2446-2453
22. Cavaillon JM, Adib-Conquy M, (2006) Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* 10: 233
23. Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R, (2007) Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* 447: 972-978
24. Mendes ME, Baggio-Zappia GL, Brunialti MK, Fernandes Mda L, Rapozo MM, Salomao R, (2011) Differential expression of toll-like receptor signaling cascades in LPS-tolerant human peripheral blood mononuclear cells. *Immunobiology* 216: 285-295
25. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg FW, (1995) Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood* 85: 1341-1347
26. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM, (1991) Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *The Journal of clinical investigation* 88: 1747-1754
27. Chiang N, Fredman G, Backhed F, Oh SF, Vickery T, Schmidt BA, Serhan CN, (2012) Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. *Nature* 484: 524-528
28. Etzerodt A, Moestrup SK, (2013) CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxidants & redox signaling* 18: 2352-2363

29. Fabrick BO, van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Schornagel K, Vloet RP, Dijkstra CD, van den Berg TK, (2009) The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* 113: 887-892
30. Alves-Januzzi AB, Brunialti MK, Salomao R, (2015) CD163 and CD206 expression does not correlate with tolerance and cytokine production in LPS-tolerant human monocytes. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*

Figure Legends

Figure 1: Analysis charts to detect the production of ROS and NO in monocytes and subpopulations. Individual cells (singlets) were selected, and monocytes were characterized by light scatter and side positivity for CD14 (A). Another side vs. forward light scatter plot was used to exclude smaller cells (B). CD163+ and CD163- subsets were established based on isotype control (C). ROS generation was measured by GMFI of DCFH represented in histogram graphics for the CD14+ monocytes and the monocyte subsets CD14+ CD163+ and CD14+ CD163-. The graphics are representative of an experiment for ROS detection in healthy volunteers and septic patients in unstimulated cells and after stimulation with *P. aeruginosa*.

Figure 2: Strategy to detect intracellular cytokine (IL-6) in monocytes and CD163+ and CD163- subsets. **A.** Individual cells (singlets) were selected, and monocytes were characterized by light scatter and side positivity for CD14. Dot-plots were drawn with IL-6 versus the side scatter parameter. The quadrants for IL-6 positivity were established based on unstimulated cells (control), and the percentages of positive stained cells was determined after stimulation. **B.** CD163+ and CD163- subsets of monocytes were established based on isotype control, and the percentages of cells positively stained for IL-6 were measured after stimulation. The graphics are representative of an experiment for IL-6 detection in a healthy volunteer and in a septic patient in unstimulated cells and after stimulation with *P. aeruginosa*.

Figure 3: Detection of ROS, NO, IL-6 and TNF- α in monocytes of healthy volunteers and patients with severe sepsis and septic shock. Whole blood was obtained from 19 healthy volunteers (blank boxes), 19 patients with severe sepsis (boxes in light gray) and 15 patients with septic shock (boxes in dark gray). Monocyte analysis was performed by assessing individual cells (singlets) combined with the side-scatter parameter versus CD14-positiveness. The values for ROS and NO are shown as geometric mean fluorescence intensities (GMFI) of DCFH and DAF, respectively. Cytokine values are shown as percentages of cells producing IL-6 and TNF- α . $P < 0.001$ for all stimuli compared between groups (Kruskal-wallis). $*P < 0.05$ compared to healthy volunteers, $\#P < 0.05$ compared to severe sepsis patients (Mann-Whitney).

Figure 4: Correlation between SOFA score and ROS production in whole blood monocytes. Data represents ROS generation in admission samples from 34 septic

patients under different stimuli and SOFA score at ICU admission. The Pearson correlation test was used. The chart shows the R and P values obtained.

Figure 5: Interaction of CD163 expression on monocytes with the production of ROS, NO, IL-6 and TNF- α . Whole blood of 34 septic patients (D0) (solid line) and 19 healthy volunteers (dot line) were analyzed after stimulation with LPS, *P. aeruginosa* and *S. aureus*. Monocyte analysis was performed by assessing individual cells (singlets) combined with side-scatter parameters versus CD14-positiveness. Monocytes were further characterized as CD163 positive and CD163 negative cells. The productions of ROS and NO were analyzed in histogram charts and quantified as the geometric mean fluorescence intensities (GMFIs) associated with the detection of DCFH and DAF, respectively. Intracellular cytokine level was based on quadrants established in the sample without stimulation and are expressed as the percentage of cytokine-producing monocytes. **P* values denote the interaction between CD163 expression and the groups of healthy volunteers and septic patients for each parameter and condition evaluated (ANOVA).

Figure 6: Detection of ROS, NO, IL-6 and TNF- α in monocytes of patients in admission and follow-up samples. Samples of 15 septic patients were assessed at D0 and D7 under different stimuli. Monocyte analysis was performed by assessing individual cells (singlets) combined with the side-scatter parameter versus CD14-positiveness. Data are shown as the geometric mean fluorescence intensities (GMFIs) of DCFH and DAF for ROS and NO, respectively, and as the percentages of cells producing IL-6 and TNF- α . **P*<0.05 compared to D0 (Wilcoxon).

Figure 7: Co-localization of gp91phox (red) and p47phox (green) by immunofluorescence. PBMCs were obtained from septic patients at admission (D0; n=20) and after 7 days of follow-up (D7; n=10) and from healthy subjects (n=10). The cell nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, blue) and gp91phox and p47phox using specific antibodies. The images were obtained using a confocal microscope (objective 60X; 5 X amplification). The graph represents the mean fluorescence intensity (MFI) obtained by co-localization analysis (co-localizationhighlighter) using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). **P*<0.05.

Figure 1

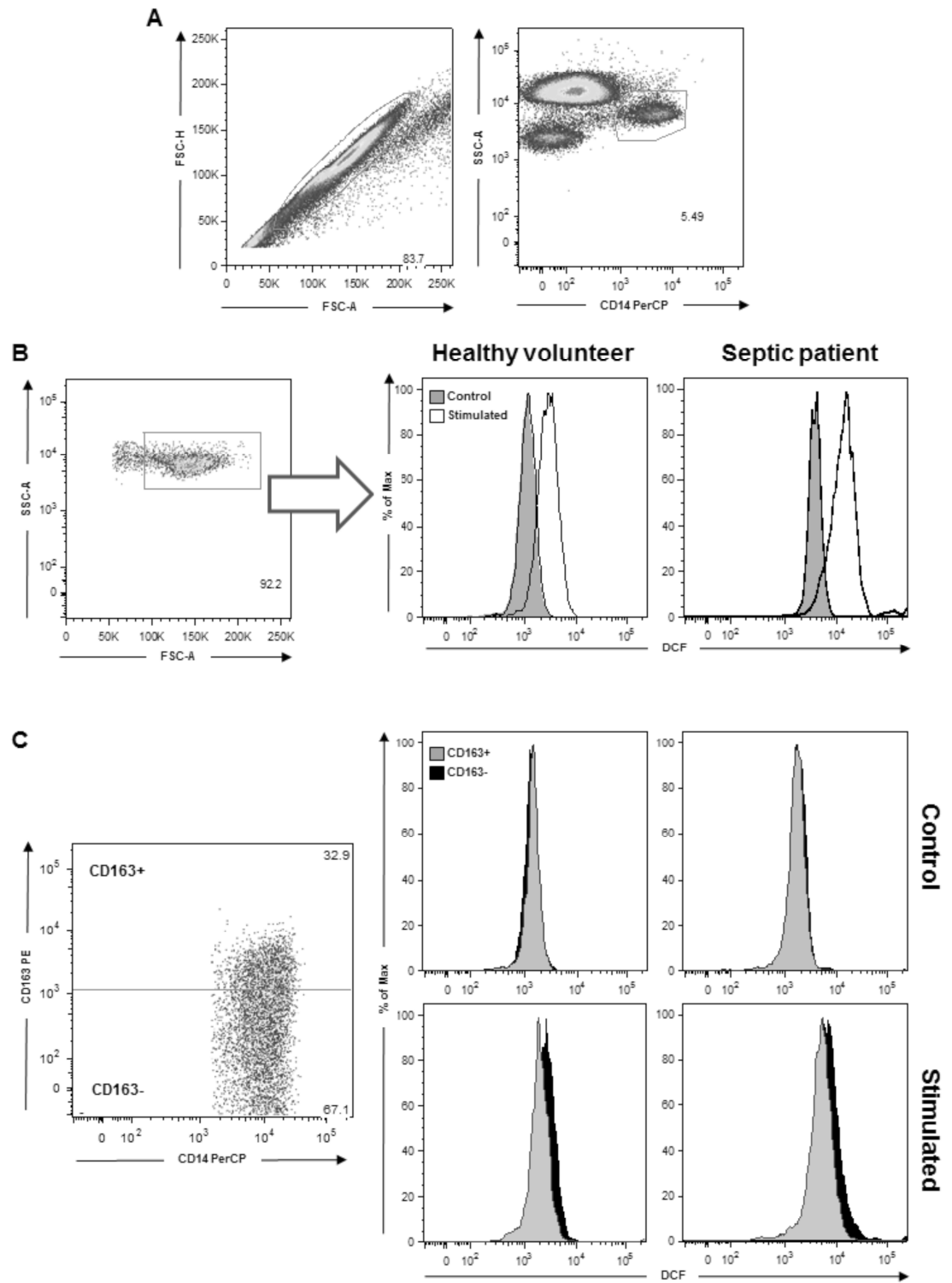


Figure 2

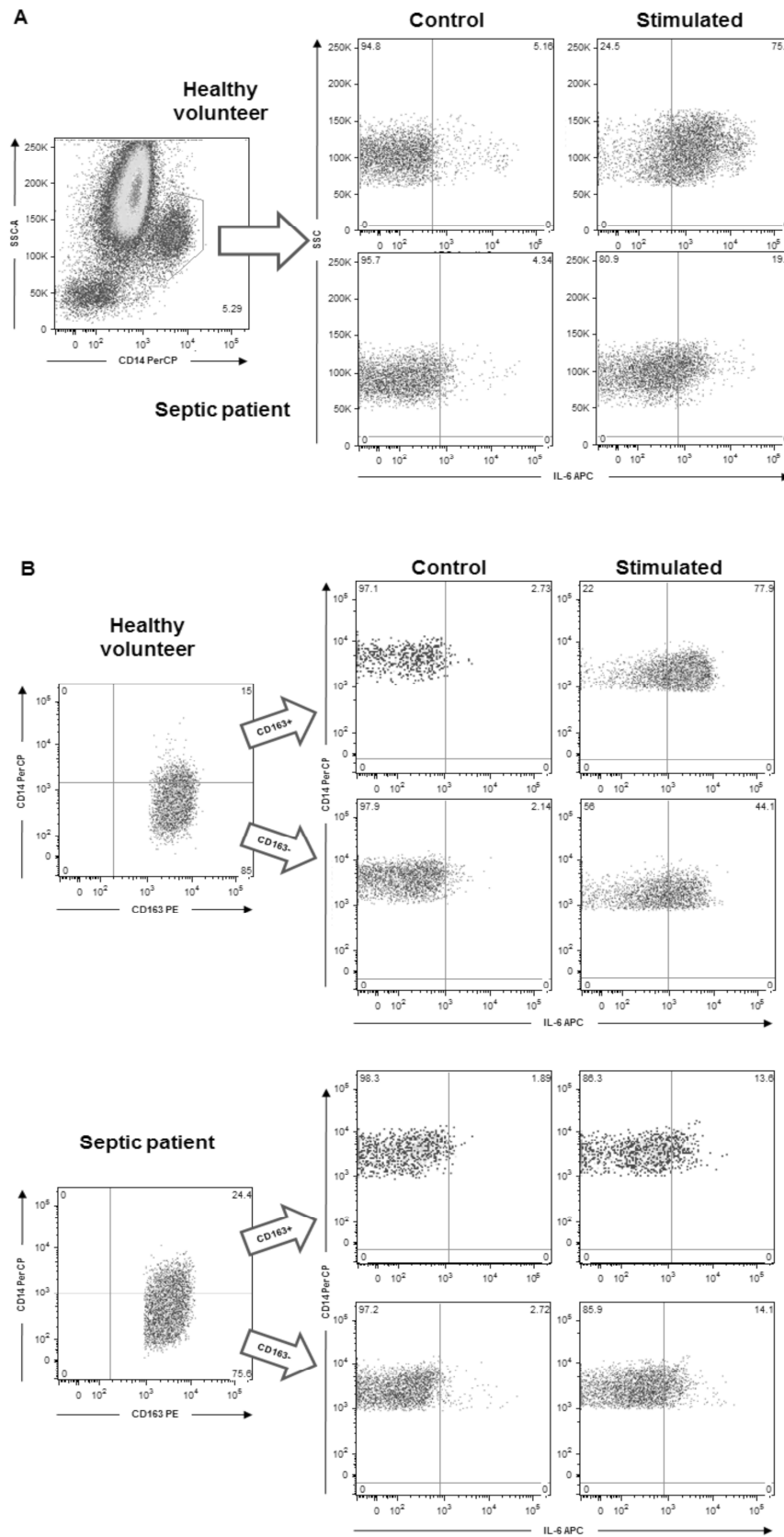


Figure 3

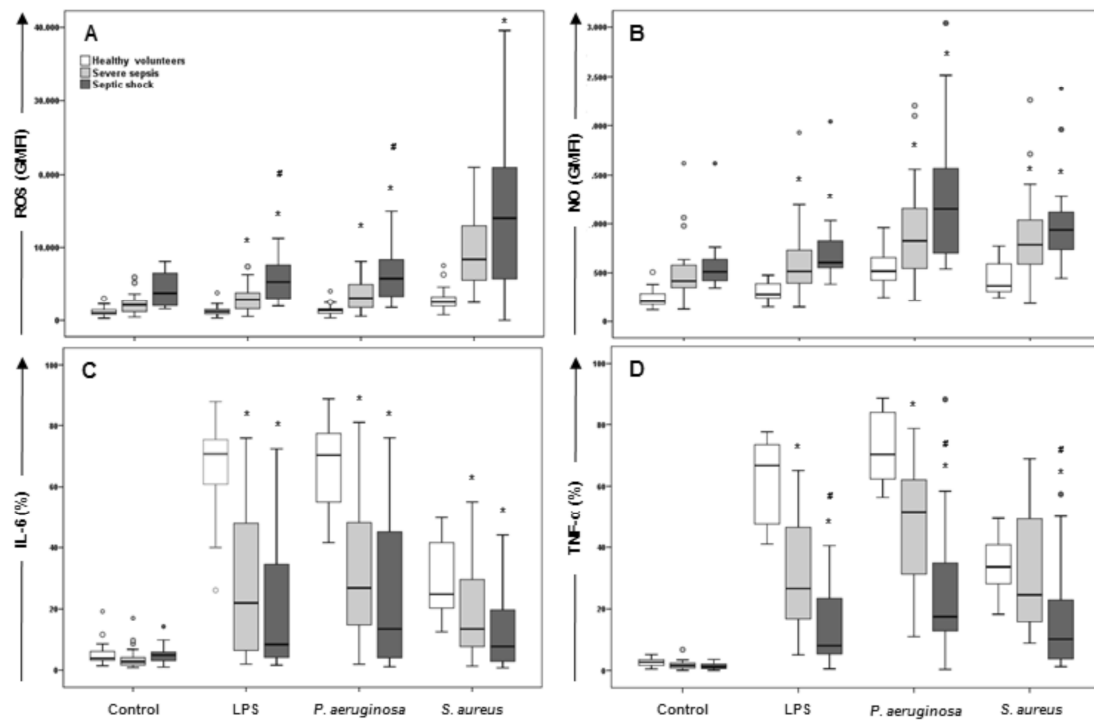


Figure 4

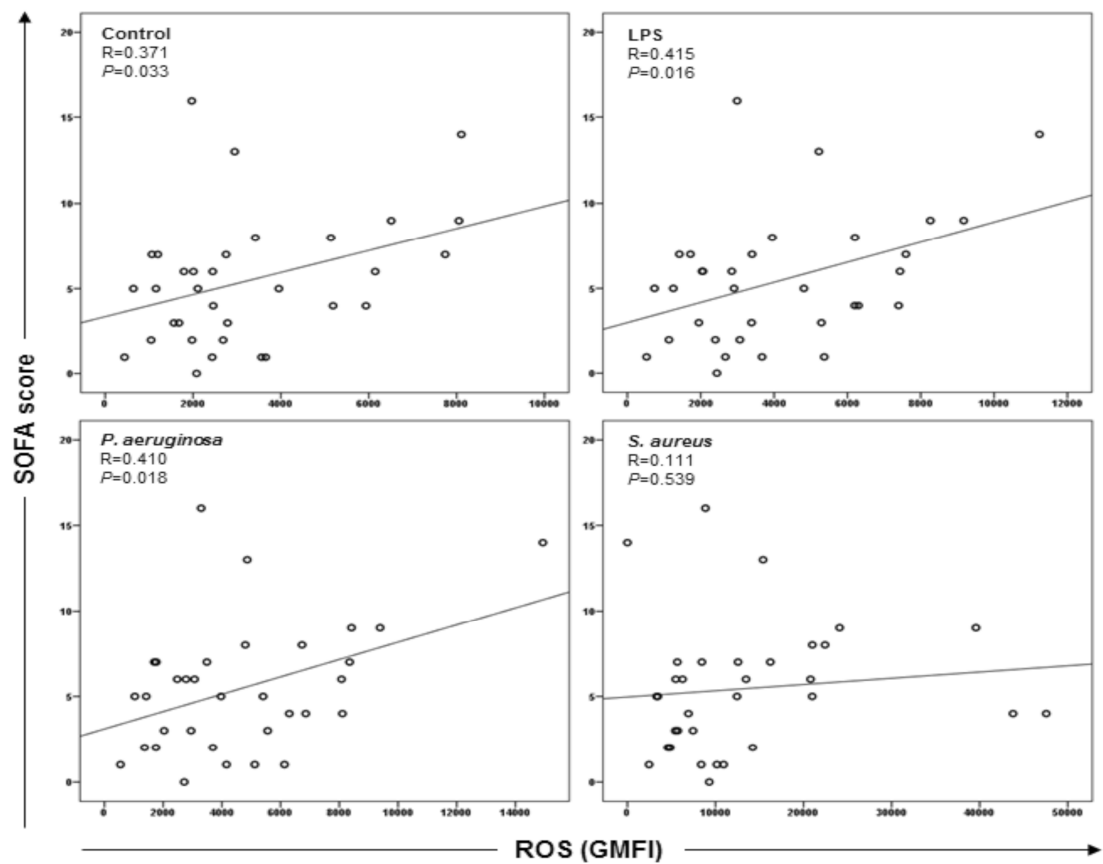


Figure 5

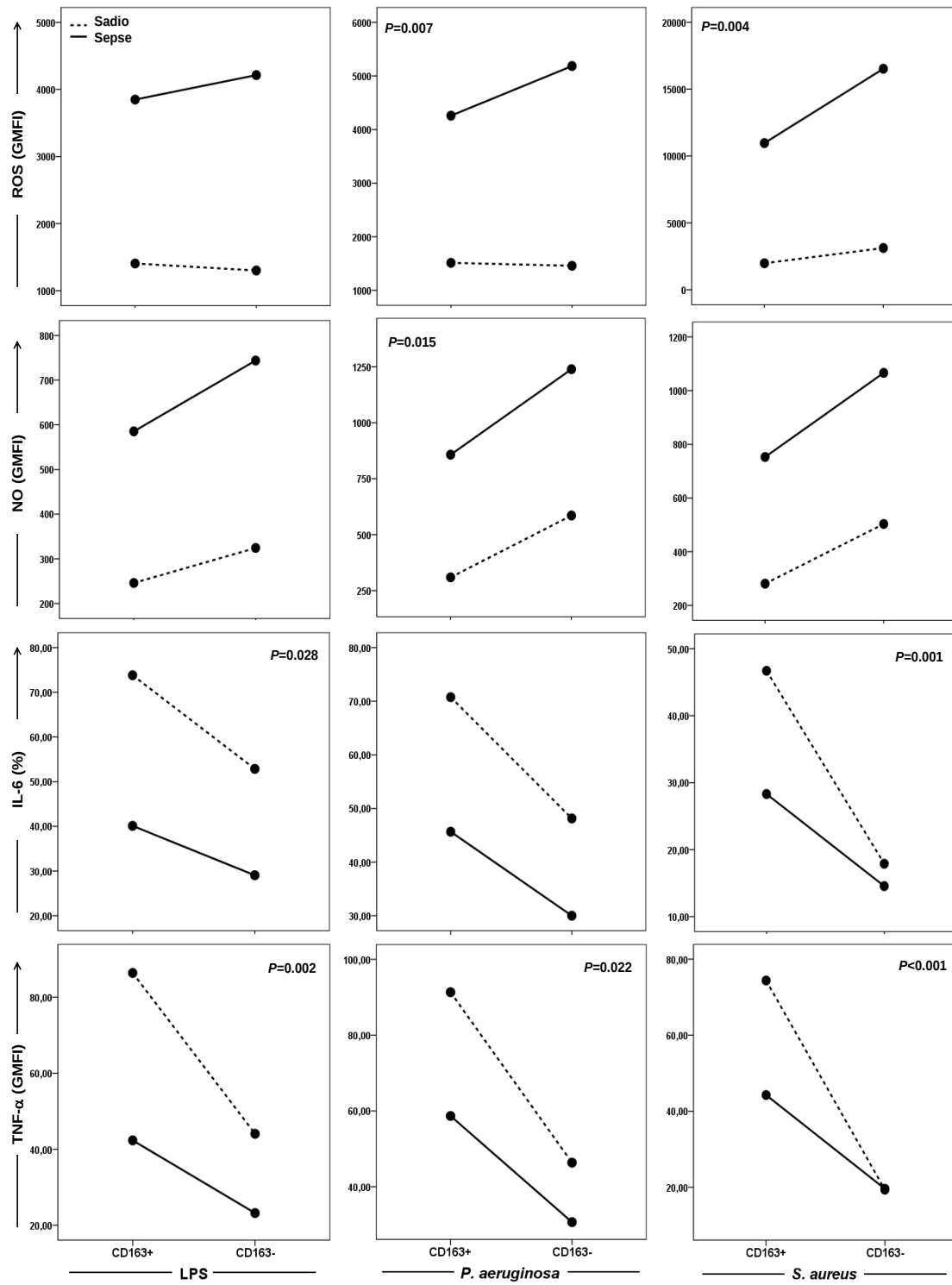


Figure 6

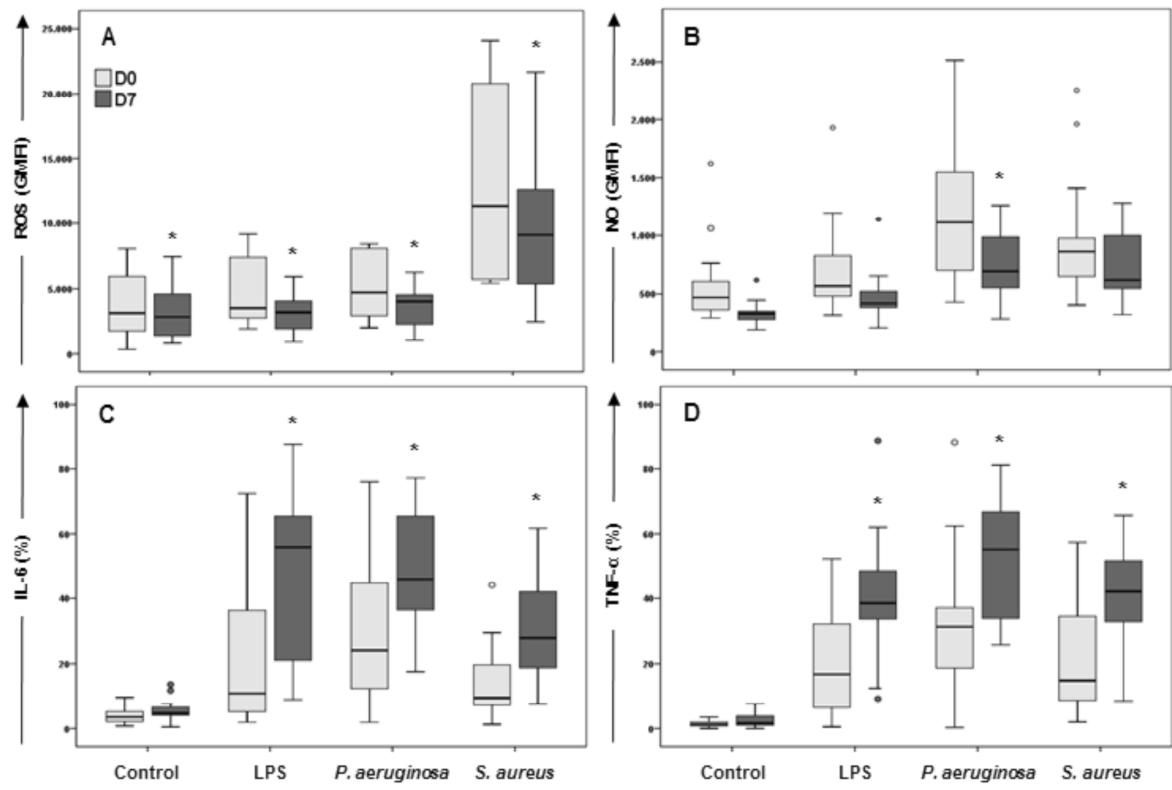


Figure 7

