

PAULO DE SOUZA FONSECA GUIMARÃES

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS *NATURAL KILLERS* (NK) EM
SANGUE DE CIRCULAÇÃO PERIFÉRICA E FLUIDO DE
LAVADO BRONCOALVEOLAR DE PACIENTES PORTADORES
DE SEPSE PULMONAR: ESTUDO DE CASOS-CONTROLE**

CURITIBA

2017

A minha amada esposa Fernanda e aos meus amados filhos Isadora e
Matheus.

Aos meus pais, Archimedes e Romilda.

Aos meus irmãos, Marcos, Sandra, Elaine e Fernando.

Enfim, a tudo o que realmente importa e aos amigos.

Agradeço à Deus sobre todas as coisas e ao maior presente que podemos ter:
a vida!

AGRADECIMENTOS

À PROFA. DRA. ANITA NISHIYAMA (Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas da UFPR), orientadora deste trabalho, pelo esforço, apoio e dedicação na realização deste estudo.

Ao DR. FERNANDO DE SOUZA F. GUIMARÃES (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research and Department of Medical Biology University of Melbourne), não melhor cientista do que irmão e grande incentivador do projeto, pelas incansáveis horas dispendidas no auxílio da realização deste estudo.

À PROFA. DRA. ALEXANDRA CRISTINA SENEGAGLIA e DRA. LIDIANE MARIA BOLDRINI LEITE (Núcleo de Tecnologia Celular da PUC-PR), pelo grande, incansável e incondicional apoio técnico na realização do trabalho.

Ao DR. FERNANDO GUIMARÃES (Hospital da Mulher “Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti” – CAISM – UNICAMP) pelo apoio técnico na realização do trabalho.

Aos colaboradores das Unidades de Terapia Intensiva e do Serviço de Endoscopia Respiratória do Hospital Universitário Cajuru que, com muita paciência, auxiliaram na coleta das amostras deste trabalho.

A todos os meus amigos e familiares, que direta ou indiretamente, tiveram participação na realização deste trabalho.

Pergunta tão rica, precisava andar por aí mendigando respostas?

Paulo Leminski

RESUMO

A sepse é uma disfunção orgânica aguda complexa potencialmente fatal consequente de uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica desencadeada por um quadro infeccioso. Os mecanismos subjacentes à fisiopatologia da sepse que envolve processos dinâmicos pró e anti-inflamatórios ainda permanecem mal compreendidos. As células do *Natural Killers* (NK) desempenham papel crucial na fisiopatologia da sepse, com íntima relação aos processos de inflamação exagerada decorrentes de sua resposta rápida e da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o interferon gama (IFN- γ). Vários estudos já mostraram que as células NK tem seus níveis reduzidos no plasma de sangue periférico de pacientes portadores de sepse. No entanto, nossa atual compreensão dos mecanismos por trás do seu tráfego celular, assim como, no seu papel no desenvolvimento da doença está restrita aos estudos em modelos animais de sepse. Neste estudo, buscamos comparar os níveis do subconjunto de células NK humanas (CD56^{bright} e CD56^{dim}) no plasma de sangue periférico e fluido de lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes portadores de sepse pulmonar. Realizou-se um estudo caso-controle constituído por 10 pacientes saudáveis (controle) e 23 pacientes portadores de sepse pulmonar internados em Unidades de Terapia Intensiva do Hospital Universitário Cajuru da Pontifícia Universidade Católica do Paraná no período de 2013 a 2015. Embora pudéssemos confirmar observações anteriormente descritas de linfopenia do plasma de sangue periférico, não foram detectadas diferenças significativas nos níveis de células NK no LBA desses pacientes. Em geral, esses achados reforçam a evidência de que a redução dos níveis de células NK no plasma de sangue periférico pode estar associada à mecanismos de morte celular e apoptose consequentes da sepse.

Palavras-chave: Células *Natural Killers*; sepse pulmonar; linfopenia; interleucinas; citocinas pró-inflamatórias; CD4; CD8; lavado broncoalveolar.

ABSTRACT

Sepsis is a complex systemic inflammatory syndrome, the most common cause of which is attributed to systemic underlying bacterial infection. The complete mechanisms of the dynamic pro- and anti-inflammatory processes underlying the pathophysiology of sepsis remain poorly understood. Natural killer (NK) cells play a crucial role in the pathophysiology of sepsis, leading to exaggerated inflammation due their rapid response and production of pro-inflammatory cytokines such as interferon gamma (IFN- γ). Several studies have already shown that NK cells undergo lymphopenia in the peripheral blood of patients with sepsis. However, our understanding of the mechanisms behind its cellular trafficking and its role in disease development is restricted to studies in animal models. In this study, we aimed to compare the human NK cell subset (CD56bright or dim) levels in the peripheral blood and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of sepsis patients. We conducted a case-control study with a sample size consisting of 10 control patients and 23 sepsis patients enrolled at the Hospital Cajuru (Curitiba/PR, Brazil) from 2013 to 2015. Although we were able to confirm previous observations of peripheral blood lymphopenia, no significant differences were detected in NK cell levels in the BAL fluid of these patients. Overall, these findings strengthened the evidence that peripheral blood lymphopenia is likely to be associated with cell death as a consequence of sepsis.

Keywords: natural killer cells; lung sepsis; lymphopenia; bronchoalveolar lavage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Resposta inflamatória em cascata.....	06
Figura 2. Dinâmica das mudanças na resposta SIRS e CARS	07
Figura 3. Ativação de células NK	18
Figura 4. Materiais para realização de broncoscopia	31
Figura 5. Fibrobroncoscópio	32
Figura 6. Fonte de luz halógena	33
Figura 7. Aparelho de Citometria de Fluxo	33
Figura 8. Posicionamento do endoscopista.	35
Figura 9. Frasco de coleta de secreção brônquica	35
Figura 10. Marcação de antígenos intracelulares e de superfície por Citometria de Fluxo	37
Figura 11. Concentrações de interleucina 6 (IL-6) do plasma e LBA a de pacientes com sepse	49
Figura 12. Concentrações de interleucina 2 e 4 (IL-2 e IL-4) do plasma e LBA de pacientes com sepse.....	49
Figura 13. Concentrações de interferon gama (IFN- γ) e fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) em pacientes com sepse	50
Figura 14. Representação dos subconjuntos de células NK CD3 ^{neg} , CD56 ^{bright} e CD56 ^{dim} por citometria de fluxo	51
Figura 15. Subconjunto de células <i>Natural killer</i> (NK)	52
Figura 16. Subconjunto de células <i>Natural Killer</i> (NK) CD 56 ^{dim} obtido a partir de amostras de plasma e LBA de pacientes com sepse	53

Figura 17. Representação dos subconjuntos de células NK CD4 ⁺ e CD8 ⁺ por citometria de fluxo	54
Figura 18. Subconjunto de células T CD4 ⁺ , obtido a partir de amostras de plasma e LBA de pacientes com sepse	55
Figura 19. Subconjunto de células T CD8 ⁺ , obtido a partir de amostras de plasma e LBA de pacientes com sepse	56

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1. Critérios de diagnóstico para sepse	4
Tabela 2. Sepse severa	5
Quadro 1. Conjunto de Anticorpos Utilizados	39
Tabela 3. Parâmetros clínicos dos pacientes portadores de sepse pulmonar e casos controle	42
Tabela 4. Resultado de culturas solicitadas a partir do lavado broncoalveolar (LBA)	43
Tabela 5. Perfil clínico e laboratorial dos pacientes portadores de sepse	44

LISTA DE GRÁFICOS:

Gráfico 1. Relação da concentração plasmática de Vitamina D [25(OH)D]	47
Gráfico 2. Relação da concentração plasmática de albumina	47
Gráfico 3. Relação da concentração plasmática de Proteína C Reativa (PCR)	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SIRS	Síndrome de resposta inflamatória Sistêmica
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
MRSA	<i>Methicillin resistente Staphylococcus aureus</i>
FMOS	Falência de Múltiplos Órgãos e Sistemas
PCR	Proteína C Reativa
TLR	<i>Toll like receptors</i>
ROS	Reactive oxygen species
PCT	Pró-calcitonina
NO	<i>Nitric oxide</i>
CARS	<i>Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome</i>
APACHE II	<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation</i>
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
MEDS	<i>Mortality in Emergency Department Sepsis</i>
TNF- α	Fator alfa de necrose tumoral
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IFN- γ	Interferon gama
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
PAMPs	<i>Microbial associated molecular patterns</i>
DAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>

LPS	Lipopolissacarídeo
NF- κ β	Fator nuclear capa beta
NK	<i>Natural Killer</i>
Th	Células T <i>helper</i>
T _{reg}	Células T reguladoras
LBA	Lavado broncoalveolar
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Definição de sepse	01
1.1. Epidemiologia	01
1.2. Crterios diagnsticos	02
1.3. Fisiopatologia	08
1.4.1 Resposta <i>normal</i> à infecção	08
1.4.2 Resposta exacerbada à infecção observada na sepse	09
1.4.3 Resposta endotelial	11
1.4.4 Ativação de citocinas	12
1.4.5 Papel das células NK	16
1.4.6 Fatores clnicos que interferem na resposta do hospedeiro à sepse	19
1.5 Tratamento da sepse	22
1.5.1. Terapia antimicrobiana	22
1.5.2. Reposição hidroeletrólita	23
1.5.3. Vasopressores e agentes inotrópicos	24
1.5.4. Corticosteroides	25
1.5.5. Estudos e desafios no tratamento da sepse	26
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo geral	29
3.2. Objetivos específicos	29

4. MÉTODOS	30
4.1. Descrição das amostras	30
4.1.1. Critérios de inclusão	30
4.1.2. Critérios de exclusão	31
4.2. Materiais	31
4.2.1. Materiais hospitalares descartáveis	31
4.2.2. Reagentes	32
4.2.3. Equipamentos de broncoscopia	32
4.2.4. Equipamentos de citometria	33
4.3. Descrição dos procedimentos	34
4.3.1. Lavado broncoalveolar	34
4.3.2. Isolamento das células do lavado broncoalveolar e do sangue periférico	36
4.3.3. Caracterização celular por citometria de fluxo	37
4.3.4. Determinação de citocinas por citometria de fluxo	39
4.3.5. Análise estatística	40
5. RESULTADOS	41
5.1. Epidemiologia da amostra:	41
5.2. Concentrações das citocinas pró-inflamatórias em amostras de LBA e plasma em pacientes portadores de sepse	48
5.3. Subconjuntos das células NK (CD3⁻, CD56^{bright} e CD56^{dim}) em amostras de LBA e plasma em pacientes portadores de sepse	50
5.4. Concentração das células T CD4⁺ e T CD8⁺ em amostras de LBA e plasma em pacientes portadores de sepse	53

6. DISCUSSÃO	57
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
8. CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67
NORMAS ADOTADAS	76
BASES DE DADOS CONSULTADAS	77
ANEXO 1 - BRONCOSCOPIA E LAVADO BRONCOALVEOLAR	78
ANEXO 2 - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	89
ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	96
ANEXO 4 - PROTOCOLO DE TRATAMENTO DA SEPSE	102
ANEXO 5 - PROTOCOLO CITOMETRIA DE FLUXO	104
ANEXO 6 - ARTIGO PUBLICADO	107
ANEXO 7 - ARTIGO A SER SUBMETIDO	117