David Pablo da Cunha Jolvino

**AVALIAÇÃO DA VIA DE NECROPTOSE EM PACIENTES COM
SEPSE E SUA CORRELAÇÃO COM A GRAVIDADE E
PARÂMETROS CLÍNICOS DESTA ENFERMIDADE**

Dissertação apresentada à Faculdade
Israelita de Ciências da Saúde Albert
Einstein para obtenção do Título de Mestre
em Ciências da Saúde.

São Paulo

2019

David Pablo da Cunha Jolvino

**AVALIAÇÃO DA VIA DE NECROPTOSE EM PACIENTES COM
SEPSE E SUA CORRELAÇÃO COM A GRAVIDADE E
PARÂMETROS CLÍNICOS DESTA ENFERMIDADE**

Dissertação apresentada à Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Weinlich

Coorientador: Prof. Dr. Ary Serpa Neto

São Paulo

2019

J75a

Jolvino, David Pablo da Cunha

Avaliação da via de necroptose em pacientes com sepse e sua correlação com a gravidade e parâmetros clínicos desta enfermidade / David Pablo da Cunha Jolvino. -- São Paulo, 2019.
xv, 125 f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Assessment of the necroptotic pathway in septic patients and it's correlation with disease severity and patient's clinical parameters.*

1. RIPK3. 2. MLKL. 3. Necroptose. 4. Sepse 5. Choque séptico.

NLM – QZ 180

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

David Pablo da Cunha Jolvino

**AVALIAÇÃO DA VIA DE NECROPTOSE EM PACIENTES COM
SEPSE E SUA CORRELAÇÃO COM A GRAVIDADE E
PARÂMETROS CLÍNICOS DESTA ENFERMIDADE**

Presidente da banca: Dr. Ricardo Weinlich

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Profa. Dra. Luciana Cavaleiro Marti

Profa. Dra. Raquel de Melo Alves Paiva

Profa. Dra. Caroline Serrano Do Nascimento

Membros suplentes:

Profa. Dra. Patrícia Severino

Prof. Dr. Fabiano Pinheiro da Silva

Aprovada em: 03/09/2019.

Agradecimentos

A presente dissertação de mestrado não poderia ser finalizada sem o enorme reconhecimento do apoio de várias pessoas. Em primeiro lugar, sempre agradecerei ao Pai Celestial pela a vida e por essa incrível oportunidade, que é impossível utilizar palavras que possam descrever esse sentimento.

Quero agradecer ao meu orientador Ricardo Weinlich, por todo o suporte, confiança, empenho e orientação em todos os sentidos, especialmente na arte em superar e vencer os desafios. Muito obrigado por sempre que necessário ter me corrigido sem jamais me desmotivar. Embora o propósito do mestrado, de uma forma objetiva, é para o crescimento profissional, você foi capaz de me ensinar diversas coisas, como ser de fato um profissional mais bem qualificado e preparado, e de uma forma admirável me mostrou por incontáveis vezes como ser uma pessoa melhor. Sou muito grato por você ser um exemplo para mim. Além da experiência do mestrado, essa bagagem adquirida eu sempre levarei comigo. Obrigado por tudo!

Desejo agradecer de todo meu coração as pessoas que estiveram comigo nessa jornada, ao meu coorientador Ary Serpa Neto e toda a equipe de médicos e enfermagem no auxílio de recrutamento e coleta de amostras dos pacientes, aos voluntários que aceitaram doar “o sangue” literalmente para este projeto

Em especial também quero agradecer a Bruna Bizzarro Coli, Larissa Cardoso Zanetti, Cléia Costa, Letícia Hummel, Caroline Mitiká, Laudicéia Almeida, Fernanda Mansur, Isadora Oliveira, Ana Eduarda Zulim de Carvalho, Bruna Mariana, e aos meus colegas de grupo, cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos. Agradeço aos funcionários do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein e todos os envolvidos no programa de pós-graduação que contribuíram para minha formação. Quero agradecer à minha família, amigos, e principalmente ao Wellington Gazzola, pelo companheirismo e apoio incondicional, que todos juntos me proporcionaram força para vencer mais uma etapa tão importante na minha vida.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para realização deste estudo, habilitado como processo nº 2016/18110-5

Obrigado a todos!

“Não é preciso ter olhos abertos para ver o sol, nem é preciso ter ouvidos afiados para ouvir o trovão. Para ser vitorioso você precisa ver o que não está visível.”

(Sun Tzu – A arte da guerra)

Sumário

Agradecimentos.....	v
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xi
Lista de abreviaturas	xii
Resumo	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia da sepse.....	1
1.2 Fisiopatologia e definições de sepse	2
1.3 Inflamação e morte celular	6
1.3.1 Apoptose	8
1.3.2 Piroptose	11
1.3.3 Necroptose	12
1.4 Morte celular e sepse	14
1.5 Objetivos.....	18
2 MÉTODOS	19
2.1 Aspectos éticos	19
2.2 Planejamento do estudo	19
2.3 Coleta de dados e amostras.....	20
2.4 Coleta e armazenamento de dados clínicos.....	21
2.5 Análise estatística.....	21
2.6 Processamento das amostras de sangue.....	22
2.6.1 Separação das células mononucleares do sangue periférico.....	23
2.6.2 Separação do plasma e das células polimorfonucleares do sangue periférico	24
2.7 <i>Western blot</i>	25
2.8 Preparação do reagente quimioluminescente caseiro <i>para western blot</i>	26
2.9 Quantificação de citocinas por ensaio de Luminex.....	26
2.10 Análise de viabilidade de congelamento das amostras para citometria	27
2.11 Estratégias de análise de células por citometria de fluxo	28
2.12 Expressão de RIPK3 e MLKL por qPCR	29
2.13 ELISA do RIPK3	30
2.14 Cinética de morte celular	30
2.15 Treinamento e otimização dos protocolos para obtenção e análise das células. ..	31

3 RESULTADOS	32
3.1 Dados demográficos dos grupos experimentais.....	32
3.2 Coleta das amostras dos pacientes.....	37
3.3 Análise da proteína C-reativa	39
3.4 Hemograma dos grupos experimentais	39
3.5 Análise das populações celulares por citometria de fluxo	43
3.6 Quantificação das citocinas no D0 dos pacientes	49
3.7 Quantificação das citocinas do D3 dos pacientes	51
3.8 Análise da expressão gênica por qPCR	55
3.9 <i>Western blot</i> para RIPK3 e MLKL.....	57
3.10 <i>ELISA</i> de RIPK3.....	59
4 DISCUSSÃO	60
5 CONCLUSÕES	73
6 ANEXOS.....	74
7 REFERÊNCIAS	110
Abstract	
Apêndices	

Lista de figuras

Figura 1. Diagrama simplificado das três principais vias de morte	10
Figura 2. Fluxograma da coleta de sangue periférico dos grupos	21
Figura 3. Delineamento do fluxo de amostras	25
Figura 4. Relação do número e da porcentagem das coletas realizada no projeto	38
Figura 5. Representação da média de número de células e viabilidade pós processamentos de todos os pacientes	38
Figura 6. Análise da proteína C reativa do dia 0	39
Figura 7. Análise dos leucócitos dos dias: 0, 3 e 7	40
Figura 8. Hemograma dos linfócitos totais no sangue do dia 0 de coleta	41
Figura 9. Análise dos neutrófilos do dia 0	42
Figura 10. Análise da porcentagem de linfócitos B nos diferentes grupos experimentais no dia 0	44
Figura 11. Análise da porcentagem de linfócitos T nos diferentes grupos experimentais no dia 0	45
Figura 12. Análise da porcentagem de NKT nos diferentes grupos experimentais no dia 0	46
Figura 13. Análise da porcentagem de NK nos diferentes grupos experimentais no dia 0	48
Figura 14. Análise da porcentagem de monócitos nos diferentes grupos experimentais no dia 0	49
Figura 15. Análise das citocinas por Luminex das amostras dos pacientes no dia 0 ...	50
Figura 16. Análise das citocinas por Luminex das amostras dos pacientes com sepse e controle no dia 0	51
Figura 17. Análise das citocinas por Luminex das amostras dos pacientes no dia 3 ...	52
Figura 18. Análise das citocinas por Luminex das amostras dos pacientes com sepse e controle no dia 3	53
Figura 19. Análise das citocinas por Luminex das amostras dos pacientes com sepse e choque séptico no dia 7	54
Figura 20. <i>Heatmap</i> da expressão das citocinas obtidas das amostras dos grupos experimentais do dia 0	55

Figura 21. Análise da expressão gênica por qPCR de RIPK3 e MLKL dos grupos experimentais no dia 0	56
Figura 22. <i>Western blot</i> de RIPK3 e MLKL dos grupos experimentais no dia 0	58

Lista de tabelas

Tabela 1. Escala de avaliação sequencial de disfunção orgânica (<i>Sequential Organ Failure Assessment Score</i>).....	6
Tabela 2. Painel de anticorpos para diferenciação das principais populações celulares	29
Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para os ensaios de qPCR	29
Tabela 4. Características demográficas dos grupos experimentais	33
Tabela 5. Tabela demográfica dos pacientes com sepse e choque séptico	35
Tabela 6. Desfecho clínico dos grupos experimentais com sepse.....	36
Tabela 7. Características do tipo de infecção	36
Tabela 8. Estratégia de análise para diferenciação das principais populações celulares	43

Lista de abreviaturas

A1	<i>Protein A1 (BCL2-related protein A1)</i>
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
ASC	<i>Adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain</i>
ATP	adenosina trifosfato
BAD	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
BAX	<i>BCL2 associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BID	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
BIM	<i>Bcl-2-like protein 11</i>
CARS	Síndrome da resposta anti-inflamatória sistêmica (<i>Compensatory anti-inflammatory response syndrome</i>)
cFLIP	<i>CASP8 and FADD-like apoptosis regulator</i>
clAP	<i>Cellular inhibitor of apoptosis</i>
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
DAI	<i>DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors</i>
DAMP	Padrões moleculares associados à lesão (<i>damage-associated molecular patterns</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensaio imunoadsorvente ligado a enzima (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FasL	Fas ligante (<i>Fas ligand</i>)
IAPs	<i>Inhibitor of apoptosis proteins</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
MARS	Síndrome da resposta antagonista mista (<i>Mixed antagonist response syndrome</i>)
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia 1</i>
MLKL	<i>Mixed lineage kinase domain-like pseudokinase</i>

Nlrc4	<i>NLR family, CARD domain containing 4</i>
NLRP3	<i>NLR family pyrin domain containing 3</i>
NOXA	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
PAM	Pressão arterial média
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos (<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>)
PaO ₂ /FIO ₂	Pressão parcial de oxigênio
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
RHIM	<i>Homotypic interaction motif</i>
RIG-I	<i>Retinoic-acid-inducible protein 1</i>
RIPK1	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein Kinase 1</i>
RIPK3	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein Kinase 3</i>
ROS	Espécie reativa de oxigênio
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (<i>systemic inflammatory response syndrome</i>)
SNC	Sistema nervoso central
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment Score</i>
STING	<i>Stimulator of interferon genes</i>
SvcO ₂	Saturação venosa central de oxigênio
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TNFR1	Receptor do fator de necrose tumoral 1 (<i>Tumor necrosis factor receptor 1</i>)
TNFRSF	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily</i>
TRADD	<i>TNFR-associated death domain</i>
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRPM	<i>Transient receptor potential cation channel, subfamily M</i>
TRPM7	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily M member 7</i>
UTI	Unidade de terapia intensiva

Resumo

Introdução: A sepse é definida como uma disfunção de órgãos com risco de vida causada por uma resposta desregulada do hospedeiro frente à infecção, levando a óbito em aproximadamente 30% dos casos. Apesar das descobertas recentes, os mecanismos envolvidos na iniciação e na progressão da sepse ainda não foram completamente elucidados, dificultando seu tratamento. Uma de suas características é a morte massiva de células do sistema imune. A necroptose, uma via de morte celular recentemente descoberta, tem alto potencial inflamatório e já está relacionada em diversas patologias inflamatórias e infecciosas. Em modelos animais de sepse, camundongos deficientes em componentes da via de necroptose ou que foram tratados com inibidores farmacológicos contra esta via apresentaram menor mortalidade, menor número e intensidade de disfunções orgânicas, indicando que a necroptose contribui para os efeitos deletérios desta condição. **Objetivos:** Investigar se há um aumento nos níveis de expressão de moléculas da via de necroptose em células do sangue periférico de pacientes com sepse/choque séptico comparado a pacientes controles sem infecção e internados na UTI, e analisar se estes níveis se correlacionam com os diferentes grupos ou com a gravidade da doença. Também foram investigadas as alterações no componente celular imune do sangue periférico destes pacientes bem como a expressão de citocinas e quimiocinas. **Métodos:** Foram coletadas amostras de sangue periférico de um total de 80 pacientes divididos nos diferentes grupos experimentais: controle saudável, controle UTI, sepse e choque séptico e realizado análises por meio de técnicas de Luminex, citometria de fluxo, qPCR e *western blot*. **Resultados:** Das amostras de plasma dos pacientes, RIPK3 e as citocinas e quimiocinas IL-4, IP-10 (CXCL 10), IL-8, MIP-1 beta, IL-1 alfa e E-selectina apresentaram expressão diferencial com valores-p <0,0001 quando comparadas entre os grupos de sepse e não sepse. Foram observadas por citometria de fluxo diferenças nas porcentagens das populações de monócitos, NK e NKT nos diferentes grupos experimentais, levantando a possibilidade de utilizar estas proporções para diferenciar pacientes do quadro de sepse e choque séptico. Ao contrário da hipótese inicial, em nossa coorte, a expressão gênica de RIPK3 e MLKL em PBMC analisada por qPCR não apresentou diferenças significativas entre os grupos. Interessantemente, há somente uma discreta redução dos níveis proteicos de MLKL nos pacientes sépticos comparados ao grupo controle, não caracterizando assim uma sensibilização destas

células à necroptose. **Conclusão:** Neste estudo piloto, diferenças de expressão de RIPK3 plasmático, citocinas e quimiocinas no plasma e porcentagens de subpopulações de células imunes em sangue periférico foram identificadas entre os pacientes com sepse e o grupo controle. Porém, ao contrário das expectativas, não observamos alterações significativas nos níveis intracelulares de RIPK3 e MLKL.

Descritores: RIPK3; MLKL; Necroptose; Sepse; Choque séptico

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da sepse

A sepse é uma doença de extrema relevância em termos globais, com alto impacto financeiro e social.⁽¹⁾ Ao redor do mundo apresenta taxa de mortalidade maior do que a do câncer de próstata, câncer de mama e HIV juntos, o que explicita a relevância desta condição na saúde pública.^(2,3) Sua incidência vem crescendo nas últimas décadas e o número de internações hospitalares secundárias à sepse é maior do que as decorrentes de infarto agudo do miocárdio.⁽²⁾ Ainda, a maior parte dos indivíduos acometidos tem idade superior a 60 anos, sendo muito baixa a incidência em pacientes com idade inferior a 40 anos.⁽⁴⁾ Nos EUA, anualmente, a sepse atinge aproximadamente 970.000 pessoas,⁽⁵⁾ com uma mortalidade estimada em 30%.⁽⁶⁾

Estudos epidemiológicos realizados em diferentes países apontam o choque séptico como principal causa de morte nas unidades de terapia intensiva (UTI).⁽⁶⁻⁹⁾ Em 2018, um estudo coletou dados do Sistema Único de Saúde (SUS) e, de 2006 a 2015, foram registrados 724.458 casos de sepse em 4.271 hospitais públicos e privados no Brasil. Estes números resultam em uma densidade de incidência de 47,4/100.000 pacientes-dia, sendo que a mortalidade em hospitais públicos foi de aproximadamente 55,5% e em hospitais privados 37%.⁽¹⁰⁾ Além disso, os pacientes que desenvolveram sepse em algum momento da vida têm uma menor sobrevida, mesmo aqueles sem qualquer comorbidade associada.^(11,12) Além da alta incidência e mortalidade, a sepse também está associada com elevados custos ao sistema de saúde.^(13,14) Os custos diretos de pacientes com sepse podem atingir valores seis vezes mais elevados do que os de outros pacientes internados na UTI, sendo responsáveis, nos EUA, por aproximadamente 39% dos custos hospitalares totais.^(12,13) No Brasil, um estudo calculou que a média do tempo hospitalar destes pacientes é de nove dias⁽¹⁰⁾ e em média o custo total do tratamento da sepse gira em torno de R\$35.979,37 por paciente.^(10,15) Ainda, há um padrão de altos custos nos primeiros dias de tratamento, tanto nos pacientes sobreviventes quanto nos que evoluem a óbito.^(4,16-18) Além disso, observa-se que após o terceiro dia de tratamento há um aumento ainda maior nos custos dos pacientes que vão posteriormente a óbito,

indicando uma utilização intensa de recursos na tentativa de se evitar um desfecho desfavorável.⁽⁴⁾ Além de ser bastante onerosa ao sistema de saúde pelos custos diretos, a sepse ainda impõe custos sociais indiretos bastante elevados e com grande impacto social, uma vez que frequentemente os pacientes sobreviventes apresentam perda da produtividade associada ao absenteísmo.⁽⁴⁾

1.2 Fisiopatologia e definições de sepse

A sepse é um conjunto de manifestações graves, com risco à vida, resultado de uma infecção sistêmica ou local, que culmina em uma resposta desregulada do sistema imunológico frente ao insulto, com perda do equilíbrio entre mediadores pró- e anti-inflamatórios.⁽¹⁹⁻²²⁾

Do ponto de vista tecidual, a sepse resulta da excessiva inflamação, alterações de coagulação, disfunção microcirculatória e celular, causando disfunção orgânica e morte celular.^(21,23-25) Entre as principais alterações fisiopatológicas na sepse encontram-se: 1) liberação de moléculas de adesão dos neutrófilos nas células endoteliais;⁽²⁶⁾ 2) liberação de mediadores que levam a vasodilatação e hipotensão;⁽²⁶⁾ 3) quebra da barreira endotelial e aumento da permeabilidade capilar, resultando em edema intersticial;⁽²⁷⁾ 4) alterações na microcirculação, levando a um fluxo mais lento e heterogêneo nos leitos capilares;⁽²⁸⁾ e 5) alteração do sistema de coagulação onde há a indução de um estado pró-coagulante, contribuindo para a hipoperfusão tecidual e evolução para coagulação intravascular disseminada (CIVD).^(29,30)

Em relação à inflamação, há uma ativação de mediadores pró-inflamatórios exagerada e sustentada, em resposta aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs – *Pathogen-associated molecular patterns*) de micro-organismos invasores e aos padrões moleculares associados à lesão (DAMPs – *damage-associated molecular patterns*) liberados por células danificadas ou mortas na circulação, que causa uma infiltração excessiva de leucócitos nos órgãos e é importante para eliminar os patógenos desencadeantes da doença.^(31,32) Porém, em paralelo com a inflamação ocasionada, mecanismos imunossupressivos também ocorrem durante a sepse podendo resultar em disfunção imune e infecções secundárias.⁽²⁹⁾ Ainda, a sepse é caracterizada por uma morte celular massiva de

diversos tipos de célula, como células imunes (principalmente linfócitos e neutrófilos) e não-imunes (por exemplo, células intestinais e hepatócitos).⁽³³⁻³⁶⁾

Sendo assim, em decorrência dos estados anti e pró-inflamatórios presentes na sepse, o paciente pode manifestar três estados: 1) pró-inflamatório, como na síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS); 2) anti-inflamatório, como na síndrome da resposta anti-inflamatória sistêmica (CARS – *Compensatory anti-inflammatory response syndrome*); e 3) misto, correspondente a síndrome da resposta antagonista mista (MARS – *Mixed antagonist response syndrome*).⁽¹⁹⁾

Em 1992, em uma conferência internacional reunindo os principais especialistas na área, foi proposta a primeira definição de sepse, denominada *Sepsis-1*.⁽³⁷⁾ Naquele momento, o quadro séptico foi definido como um processo contínuo, sendo subdividido em síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), sepse, sepse grave e choque séptico; subdivisões estas que passaram a ser utilizados na prática clínica. Para definição de SIRS foram utilizados critérios que incluíam quatro sinais clínicos comuns na inflamação como alterações na temperatura, na frequência cardíaca, na frequência respiratória e na contagem de leucócitos.⁽³⁷⁾ A sepse foi definida com a identificação de dois ou mais critérios de SIRS, além da presença de infecção confirmada ou presumida. A sepse grave foi definida como uma evolução do quadro séptico que acarreta em hipoperfusão dos órgãos e disfunção orgânica (acidose láctica, coagulopatias, oligúria e/ou alteração do nível de consciência, entre outros) e o choque séptico como um quadro com presença de sepse grave mais hipotensão arterial refratária a ressuscitação volêmica adequada.⁽³⁷⁾

Com o passar dos anos, foi percebida a necessidade de uma nova conferência, com os especialistas da área, tendo o objetivo de atualizar, padronizar e incluir novos critérios no diagnóstico da sepse.⁽³⁸⁾ Dentre as razões para uma nova classificação, as principais eram: 1) dependendo do agravamento clínico do paciente e dos sinais clínicos de inflamação haviam múltiplas definições para sepse, o que tornava algo confuso o manejo destes pacientes;⁽³⁹⁾ 2) os critérios de SIRS apresentavam falta de sensibilidade e especificidade adequadas para o monitoramento do paciente e foi observado que, com a melhor separação entre choque séptico e sinais de disfunção de orgânica, era possível encontrar números diferentes na incidência e mortalidade dos pacientes;⁽³⁸⁾ 3) a SIRS pode estar associada ou não a uma infecção, sendo que o manejo dos pacientes nos dois casos pode ser bastante diferente;⁽⁴⁰⁻⁴²⁾ e 4) a complexa fisiopatologia da sepse inclui respostas pro-

inflamatórias e anti-inflamatórias, sendo importante usar como novo eixo de classificação a disfunção orgânica.⁽⁴³⁾

Em 2001 houve uma nova conferência que propôs uma nova definição: *sepsis-2*. Com isso, uma nova definição para sepse foi criada, sendo esta caracterizada por uma síndrome clínica combinada com lesão orgânica. Embora a mudança tenha acontecido, os antigos critérios de diagnóstico para sepse foram mantidos. O mesmo aconteceu em relação à sepse grave que foi denominada como uma "sepse complicada por disfunção orgânica".⁽⁴⁴⁾ Em resumo, características semelhantes de duas definições resultaram em uma confusão para o diagnóstico da sepse, o que reforçou a ideia de uma reformulação desta definição.⁽⁴⁴⁾

Sendo assim, em fevereiro de 2016, por meio do 3º Consenso Internacional para Definição de Sepse e Choque Séptico foram estabelecidos novos parâmetros para diagnóstico (*Sepsis-3*), excluindo-se o uso da SIRS para determinação de sepse e dividindo os pacientes somente em sepse e choque séptico. A sepse passou a ser definida como a presença de disfunção orgânica secundária a uma resposta desregulada do hospedeiro frente à infecção local ou sistêmica.^(12,45) Já o choque séptico foi definido como um quadro grave de sepse onde há maior risco de morte com presença de hipotensão arterial grave, necessidade do uso de vasopressores e valores elevados de lactato sérico. Os pacientes com SIRS foram excluídos desta classificação, por exibirem uma etiologia patológica totalmente distinta da sepse.⁽⁴⁵⁾

A avaliação e o monitoramento da disfunção orgânica são imprescindíveis para uma efetiva abordagem terapêutica evitando o agravamento do quadro clínico do paciente.⁽¹²⁾ A ferramenta mais comum utilizada para esta finalidade é a escala de *Sequential Organ Failure Assessment Score* (SOFA).^(4,45-47) Além disso, para garantir a avaliação precoce da probabilidade de sepse em um paciente, foi incorporada uma escala rápida de SOFA (qSOFA, de *quick SOFA*), que avalia a alteração do estado mental, pressão arterial sistólica e frequência respiratória.^(45,48,49) A tabela 1 compila tanto os dados clínicos quanto os resultados laboratoriais que estão comumente relacionados a disfunção orgânica. Nesta escala, para cada alteração encontrada no paciente existe um critério de pontuação, sendo que o estado geral do paciente se dá pela somatória destes pontos.⁽⁴⁵⁾ Sendo assim, a classificação de sepse ocorre quando um paciente grave, com presença de infecção, acumula dois ou mais pontos na escala de SOFA.⁽⁴⁵⁾

No caso de choque séptico, como citado acima, a nova definição preconiza que estes pacientes apresentem todos os critérios presentes para o diagnóstico de sepse (infecção e dois ou mais pontos na escala de SOFA) e ainda apresentem a necessidade de uso de vasopressores para manutenção da pressão arterial média (PAM) de 65mmHg ou superior e um nível de lactato sérico superior a 2mmol/L (>18mg/dL) na ausência de hipovolemia.⁽⁴⁵⁾ Sendo assim, um dos pontos críticos na terapêutica do paciente com sepse é o reconhecimento e a monitoração dos níveis de lactato e da volemia, sendo que estes parâmetros são utilizados como marcadores de disfunção orgânica, gravidade e prognóstico. Devido ao seu impacto na gravidade e no desfecho clínico do paciente, a hiperlactatemia e a hipotensão devem ser, portanto, prontamente tratadas assim como a infecção.⁽⁴⁾

Apesar das definições de sepse e choque séptico terem passado recentemente por atualizações, o debate sobre o diagnóstico da sepse continua em aberto, dado que um dos maiores obstáculos é a heterogeneidade que os pacientes apresentam.⁽⁵⁰⁾ A resposta à infecção, por mais claro que pareça, é dependente de dois fatores: o hospedeiro e o patógeno.^(51,52) No hospedeiro vários critérios precisam ser avaliados, desde a idade,^(53,54) raça,^(55,56) gênero,^(57,58) a presença de doenças crônicas e comorbidades (diabetes, insuficiência renal, doenças cardiovasculares, doenças pulmonares, e entre outras),⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾ até se o paciente é imunocomprometido seja por medicamentos (quimioterapia ou corticosteroides) ou por doenças (câncer, HIV, indivíduos transplantados e etc.).⁽⁶²⁻⁶⁶⁾ Por outro lado, os fatores patogênicos incluem as diferentes formas de infecção (viral, bacteriana ou fúngica), as diferentes cepas de cada patógeno, a carga inicial inoculada, o local/via da infecção e até mesmo a presença de coinfeções.⁽⁶⁷⁻⁷⁰⁾

Tabela 1. Escala de avaliação sequencial de disfunção orgânica (*Sequential Organ Failure Assessment Score*)

	Pontuação				
	0	1	2	3	4
Sistema respiratório					
PaO ₂ /FIO ₂ (mmHg)	≥ 400 (53,3)	< 400 (53,3)	< 300 (40)	< 200 (26,7) com suporte respiratório	< 100 (13,3) com suporte respiratório
Coagulação					
Plaquetas x 10 ³ /μL	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Hepático					
Bilirrubina (μmol/L)	< 1,2 (20)	1,2 – 1,9 (20-32)	2,0 – 5,9 (33 – 101)	6,0 – 11,9 (102-204)	12,0 (204)
Cardiovascular					
Hipotensão	PAM ≥ 70mmHg	PAM < 70mmHg	Dopamina ≤ 5 ou dobutamina (qualquer dose)	Dopamina > 5.1 - 15 ou epinefrina ou norepinefrina ≤ 0.1	Dopamina > 15 ou norepinefrina ou epinefrina > 0,1
SNC					
Escala de coma de Glasgow	15	13 – 14	10 – 12	6 – 9	< 6
Renal					
Creatinina (mg/dL) ou fluxo urinário (mL/d)	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 3,4	3,5 – 4,9 ou < 500	< 5,0 ou < 200

PaO₂/FIO₂: pressão parcial de oxigênio; PAM: pressão arterial média; SNC: sistema nervoso central. Escala de Coma de Glasgow variam de 3 a 15 quanto maior a pontuação melhor função neurológica. Fonte: Adaptado de Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. Intensive Care Med. 1996;22(7):707-10. Table 3, The SOFA score. p. 708.⁽⁴⁷⁾

Porém, apesar de toda a heterogeneidade apresentada nos pacientes acometidos pela sepse, algumas das características são comuns a praticamente todos os quadros, entre eles a morte celular.^(35,71,72)

1.3 Inflamação e morte celular

Inicialmente, pesquisadores afirmavam que a alta mortalidade da sepse era exclusivamente decorrente de uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada.⁽³⁷⁾ Os estudos mostravam que durante a infecção o sistema imunológico

era ativado induzindo uma resposta inflamatória tão potente que consequentemente impactava na gravidade do desfecho clínico, levando possivelmente o paciente a óbito.⁽³⁷⁾ Como forma de reduzir a mortalidade sustentada por esta hipótese, estudos clínicos tinham como foco diminuir a ativação do sistema imune e controlar a inflamação, por exemplo, com altas doses de corticosteroides e anti-citocinas.^(73,74) Porém, os resultados, em geral, foram controversos e desapontadores. Um estudo mostrou que não há diferença estatística de mortalidade ou incidência de superinfecção quando se compara pacientes com choque séptico que receberam administração de corticosteroides no início do tratamento ou na terceira etapa da terapia.^(73,75) Já em um estudo, multicêntrico, em pacientes sépticos que receberam por terapia intravenosa diferentes doses do antagonista do receptor de interleucina-1 (rhIL-1ra), foi visto que há associação positiva da taxa de sobrevivência de modo dose dependente ao tratamento utilizado.⁽⁷⁶⁻⁷⁹⁾ Por outro lado, no mesmo ano, outro estudo publicado com uma coorte maior e com maior poder não encontrou diferença estatística significativa no tempo de sobrevivência entre o grupo que recebeu o tratamento com rhIL-1ra e o grupo placebo.⁽⁸⁰⁾ Estes resultados demonstraram que a gravidade e a letalidade da sepse não é tão-somente resultado de uma resposta inflamatória exacerbada, mas que a sepse é uma doença complexa, sendo que idade, comorbidades e diferentes tipos de microrganismos patogênicos trazem uma heterogeneidade de mecanismos e de sensibilidade à terapias, indicando que existem outros fatores relevantes para a alta mortalidade e morbidade induzida por este quadro.⁽⁸¹⁾

Mais tarde, Roger Bone propôs o conceito da "síndrome de resposta anti-inflamatória compensatória" (CARS),⁽⁸²⁾ onde defendeu a ideia de que seguida à uma resposta inflamatória inicial exacerbada, ocorria uma resposta anti-inflamatória, levando os pacientes com sepse a apresentar imunossupressão e serem acometidos por infecções secundárias.⁽⁸²⁾ Como já havia sido mostrado que os doentes sépticos apresentavam morte massiva de células (principalmente células do sistema imune) e que grande parte destas células pareciam morrer com fenótipo apoptótico, este tipo de morte foi rapidamente associado à indução do quadro imunossupressor nestes pacientes.^(35,83,84) Apesar de inicialmente parecer menos prejudicial do que a resposta inflamatória exacerbada, a CARS é, de fato, bastante danosa ao indivíduo; pacientes que sobrevivem ao choque séptico e desenvolvem CARS possuem um risco de óbito por infecção bem mais elevado do que na população controle.⁽⁸⁵⁾

Por outro lado, sabendo-se que processos de morte celular são tão presentes durante a sepse, foi aventada a possibilidade de que outros mecanismos de morte celular, não-apoptóticos e com características inflamatórias, poderiam contribuir para um quadro mais grave durante a sepse e/ou choque séptico.⁽⁸⁶⁾

1.3.1 Apoptose

A morte celular pode ocorrer por processos bioquímicos distintos, que podem resultar em diferentes consequências para o organismo.⁽⁸⁷⁾ A apoptose, via de morte celular clássica,⁽⁸⁸⁾ é um processo dependente de caspases (cisteína-aspartato proteases), que desmantela a célula de forma organizada, com redução do volume celular, condensação da cromatina e preservação da integridade das organelas e da membrana plasmática. Isto impede o extravasamento do conteúdo citoplasmático, o que confere a este tipo de morte características não-inflamatórias, tendo funções e papéis muito bem estabelecidos no desenvolvimento e homeostase do organismo.^(89,90) Existem duas vias principais de ativação e sinalização de apoptose, sendo elas a via extrínseca e a via intrínseca.⁽⁹¹⁻⁹³⁾

A via intrínseca é ativada, como o próprio nome sugere, através de sinais intrínsecos à célula, tais como dano no DNA, estresse reticular, rompimento de lisossomos, produção excessiva de espécie reativas de oxigênio,⁽⁹⁴⁾ falta de nutrientes ou sinais de sobrevivência.⁽⁹⁵⁾ O ponto central desta via bioquímica de apoptose é a formação de uma estrutura multimolecular chamada de apoptosomo.⁽⁹⁶⁾ A formação desta estrutura se inicia através da liberação do citocromo c da mitocôndria, um passo estritamente regulado pelos membros da família *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2).⁽⁹²⁾ Esta família é subdividida em três subfamílias, sendo a primeira caracterizada por membros anti-apoptóticos, tais como Bcl-2, *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-xL), *myeloid cell leukemia 1* (Mcl-1) e *Bcl-2-related protein A1* (A1).^(97,98) Estes membros têm como função inibir os membros de outra subfamília, chamada de *BH3-only*, que são ativados na presença dos estresses celulares citados acima. As moléculas desta subfamília, que inclui *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1* (NOXA), *p53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA), *Bcl-2-associated death promoter* (BAD), *BH3 interacting-domain death agonist* (BID), *Bcl-2-like protein 11* (BIM) entre outros, tem como função ativar dois membros da última subfamília, sendo eles *BCL2 associated X*

protein (BAX) e *Bcl-2 homologous antagonist/killer* (BAK).⁽⁹⁹⁾ Estas duas proteínas, quando ativadas, se oligomerizam na membrana externa da mitocôndria, induzindo sua despolarização e permitindo a liberação do citocromo c. Uma vez liberado da mitocôndria, o citocromo c induz a oligomerização de moléculas *Apoptotic protease activating factor 1* (APAF-1), que formam uma plataforma de recrutamento e ativação da caspase-9, denominada apoptossomo. A caspase-9, por sua vez, processa e ativa as caspases efetoras, denominadas caspase-3 e 7, que são responsáveis pela execução do fenótipo de apoptose através da clivagem de dezenas de diferentes alvos.⁽¹⁰⁰⁾

A via extrínseca, na figura 1, é ativada através da ligação de uma subfamília de receptores pertencente à família *Tumor necrosis factor receptor superfamily* (TNFRSF), denominada de receptores de morte e que inclui o receptor do fator de necrose tumoral 1 (TNFR1 – *Tumor necrosis factor receptor 1*), Fas e *Death Receptor 4/5* (DR4/DR5) com os seus ligantes cognatos fator de necrose tumoral (TNF – *Tumor necrosis factor*), Fas ligante (FasL) e *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), respectivamente. Após a interação com o ligante, os receptores se trimerizam e induzem uma mudança conformacional nas suas porções intracitoplasmáticas, que permitem o recrutamento de moléculas adaptadoras, tais como *TNFR-associated death domain* (TRADD) e o *Fas-associated protein with death domain* (FADD).⁽¹⁰¹⁾ Estas moléculas criam uma plataforma de ativação de caspases iniciadoras (caspases-8 e -10, em humanos), que podem clivar diretamente caspase-3 e caspase-7, induzindo diretamente apoptose, ou, alternativamente, clivar e ativar Bid (um membro da subfamília *BH3-only*), que pode alterar o balanço das moléculas da família Bcl-2, induzindo à liberação de citocromo c e formação do apoptossomo.⁽¹⁰²⁾

Além da ativação de nucleases e proteases, que fragmentam e condensam o DNA, um dos principais mecanismos resultantes da ativação das caspases efetoras é a exposição da fosfatidilserina na porção externa da membrana plasmática, evento que auxilia na identificação fenotípica dessa morte e funciona como um sinal para a remoção das mesmas, através de fagocitose tanto por células do entorno como por fagócitos profissionais, além de fornecer sinais anti-inflamatórios para as células fagocíticas.⁽¹⁰³⁾

Em um modelo clássico de morte celular induzida por TNF, a ligação do TNF com seu receptor TNFR1 resulta na formação de um complexo I constituído por TRADD, RIPK1, TRAF2 (ou TRAF5), cIAP1 e cIAP2, que é poliubiquitinado. Esta via é capaz de levar à indução de fatores de transcrição gênica e sobrevivência celular. No entanto, uma vez que há a desubiquitinação deste complexo por CYLD ou A20, é formado outro complexo citosólico constituído por caspase-8, FADD, cFLIP e RIPK1, que ativa a caspase-8, iniciando o processo apoptótico. Neste contexto, os dímeros de caspase-8/cFLIP suprimem a atividade de fosforilação e recrutamento de RIPK3, bloqueando a necroptose. Porém, quando caspase-8 é bloqueada ou silenciada por inibidores, como z-VAD, é formado outro complexo que se denomina necrossoma, constituído por RIPK1, RIPK3 e MLKL. A autofosforilação de RIPK1 permite o recrutamento de RIPK3, que por sua vez é capaz de se autofosforilar, recrutar e fosforilar uma pseudoquinase chamada MLKL. Após sua fosforilação, MLKL é oligomerizada e por mecanismos ainda desconhecidos, ela é capaz de interagir com fosfatidilinosídeos presentes na face interna na membrana plasmática, causando a desestabilização e permeabilização liberando conteúdo intracelular (proteases, ROS, DAMPs etc.), fenótipo clássico conhecido como necroptose. A via da piroptose canônica se dá início através de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) que ativam respectivos sensores denominados inflamassomas, que podem ser NLRP1b, NLRP3, NLRC4, AIM2 ou Pyrin. Essa ativação do inflamassoma, na figura representado por NLRP3, ativa sensores que desencadeiam o recrutamento do adaptador ASC e da pró-caspase-1 no mesmo complexo macromolecular. Após a maturação da pró-caspase 1 em caspase-1 ativa, ela é capaz de clivar diretamente a gasdermina D e maturar as citocinas precursoras pró-IL-1β e pró-IL-18 em IL-1β e IL-18, respectivamente. Poros na membrana são formados através da região N-terminal da gasdermina D oligomerizada, que resulta na liberação do conteúdo citoplasmático. A piroptose não canônica é independente de caspase-1. Nessa via, o LPS citosólico de bactérias Gram-negativas é reconhecido pela caspase-4 ou caspase-5 em células humanas ou pela caspase-11 em células murinas. Estas caspases inflamatórias clivam diretamente a gasdermina D, induzindo piroptose.

Figura 1. Diagrama simplificado das três principais vias de morte

1.3.2 Piroptose

A piroptose foi descrita em 1992 como uma morte celular bioquimicamente controlada que pode ser desencadeada por invasão de patógenos que causam alteração da homeostase celular.⁽¹⁰⁴⁾ Diferentemente do fenótipo de apoptose, este modo de morte celular apresenta pequena condensação da cromatina, permeabilização da membrana plasmática e extravasamento de conteúdo citoplasmático para o espaço extracelular, além da produção e maturação de citocinas com propriedades altamente inflamatórias, tais como a IL-1 β e IL-18.^(105,106) Tal como a apoptose, a piroptose também é dependente de caspases, mas de um subgrupo completamente distinto, sendo elas a caspase-1 e caspase-11 em modelos murinos e seus homólogos caspase-4 e caspase-5 em humanos.⁽¹⁰⁷⁾ A via canônica de ativação de piroptose se dá pela formação de complexos multiproteicos denominados inflamassomas após o reconhecimento de PAMPs ou de alterações decorrentes de estresses celulares associados a infecções ou danos celulares, tais como rompimento de lisossomo, efluxo de potássio e grande mobilização de adenosina trifosfato (ATP). Dependendo do “sensor”, tais como o *NLR family pyrin domain containing 3* (NLRP3), *NLR family, CARD domain containing 4* (NLRC4), diferentes inflamassomas são formados, sendo que a grande maioria culmina no recrutamento da molécula *Adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain* (ASC). Esta proteína contém um domínio de ativação e recrutamento de caspases (CARD), que se liga a monômeros de caspase-1 inativa, circunstância que possibilita o autoprocessamento da caspase-1 em sua forma heterotetramérica ativa. Uma vez ativa, a caspase-1 cliva a gasdermina D, molécula que quando clivada se oligomeriza, migra para a membrana plasmática, onde se insere e forma poros, que irão resultar na ruptura da mesma (Figura 1).⁽¹⁰⁸⁾ A caspase-1 ainda é responsável pelo processamento e maturação das citocinas IL-1 β e IL-18, que irão ser liberadas, num primeiro momento, pelos poros feitos pela gasdermina D e, *a posteriori*, passivamente com o rompimento da membrana.^(109,110) Alternativamente, há a possibilidade da ativação da via não-canônica dos inflamassomas e de piroptose, que se inicia pelo reconhecimento de lipopolissacarídeos (LPS) diretamente pela caspase-11.⁽¹¹¹⁾ A caspase-11, então, cliva diretamente gasdermina D ou cliva caspase-1, que irá atuar sobre seus alvos descritos acima (Figura 1). Desta forma, a piroptose se

apresenta como um tipo de morte celular extremamente inflamatório e associado a patologias graves, tais como HIV⁽¹¹²⁾ e hepatite C.⁽¹¹³⁾

1.3.3 Necroptose

O termo necroptose foi cunhado em 2005 para descrever um tipo de morte celular com características fenotípicas de necrose, mas que depende da ação da quinase *Receptor interacting serine/threonine kinase 1* (RIPK1) e que ocorre quando a caspase-8 ou as moléculas FADD ou *CASP8 and FADD-like apoptosis regulator* (cFLIP) estão inibidas ou ausentes.⁽¹¹⁴⁾ Os primeiros estímulos descritos com capacidade de ativar esta via foram os ligantes de morte FasL, TNF e TRAIL, que curiosamente estão classicamente associados a estímulos apoptóticos^(115,116) (ver seção 1.3.1). A escolha da via pela qual estes estímulos induzirão morte, se apoptose ou necroptose, se dá principalmente pela atividade do complexo Caspase-8/cFLIP/FADD; quando presente, este complexo é capaz de inibir a via de necroptose por mecanismos ainda não totalmente elucidados.^(116,117)

Uma vez ativo, RIPK1 recruta através da interação via domínios homotípicos (RHIM – *Homotypic interaction motif*), a proteína *Receptor-interacting serine/threonine-protein Kinase 3* (RIPK3), outra quinase da mesma família, que se autofosforila e se ativa. Além de se autofosforilar, RIPK3 também fosforila e ativa a pseudoquinase *mixed lineage kinase domain-like pseudokinase* (MLKL), que se oligomeriza e migra para a membrana plasmática.⁽¹¹⁸⁾ Os oligômeros de MLKL interagem com fosfatidilinosítídeos presentes na face interna na membrana, causando a desestabilização e permeabilização da mesma (Figura 1). O mecanismo pelo qual ocorre esta ruptura ainda é pouco conhecido; alguns grupos descrevem uma ação direta do MLKL, mostrando que este consegue permeabilizar sozinho lipossomas; por outro lado, outros grupos relataram uma ação indireta do MLKL, seja por alterar o influxo de íons (principalmente cálcio e sódio) ou por ativar canais *transient receptor potential cation channel, subfamily M* (TRPM), por exemplo o *transient receptor potential cation channel subfamily M member 7* (TRPM7).⁽¹¹⁸⁻¹²⁰⁾

Além dos membros da família de ligantes de morte, diversos outros estímulos foram descritos como indutores de necroptose, sendo eles: receptores do tipo Toll (TLR3 e TLR4), receptores virais *Stimulator of interferon genes* (STING),

retinoic-acid-inducible protein 1 (RIG-I), *DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors* (DAI), receptores de interferons (IFNAR), dano no DNA (UV, irradiação gama), hipóxia, agentes alquilantes, quimioterápicos, entre outros.⁽¹²¹⁻¹²⁵⁾ Em alguns destes casos, a atividade quinase de RIPK1 não é só dispensável, mas também supressora da via de necroptose.⁽¹²⁶⁾ Neste contexto, a ativação da via se dá diretamente pelo recrutamento e ativação de RIPK3 e, em seguida, de MLKL. Sendo assim, a definição mais atualizada de necroptose é uma via dependente da atividade quinase de RIPK3, que é executada por MLKL e modulada pela atividade e presença de RIPK1.⁽¹²⁶⁾

A ruptura da membrana plasmática, com a liberação do conteúdo intracelular [proteases, espécie reativa de oxigênio (ROS), DNA, entre outros DAMPs], pelos mecanismos mediados por MLKL fazem com que este tipo de morte esteja associado a uma forte resposta inflamatória e eliciação de resposta imune.^(118,127) Vale ressaltar, porém, que diferentemente de piroptose, a necroptose não induz a maturação de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 β e IL-18. Existe ainda uma corrente de pensamento que, em contextos específicos, a morte por necroptose pode assumir uma função “anti-inflamatória”. Isto se daria quando células inflamatórias, que estão produzindo quantidades grandes de citocinas e quimiocinas, são rapidamente mortas por esta via, bloqueando a produção contínua de mais moléculas inflamatórias.⁽¹²⁸⁾ Esta hipótese, porém, ainda precisa ser testada em modelos experimentais mais sofisticados do que os utilizados até o momento para se avaliar qual é a relevância deste mecanismo frente ao extravasamento de seu conteúdo intracitoplasmático.⁽¹²⁸⁾

A relevância fisiopatológica desta via foi inicialmente demonstrada no artigo que inclusive cunhou o termo necroptose.⁽¹¹⁴⁾ Neste trabalho, a inibição desta via pelo uso de inibidores da atividade quinase de RIPK1 diminuiu os efeitos deletérios de isquemia cerebral.⁽¹¹⁴⁾ Em seguida, a necroptose foi envolvida em diversos processos fisiológicos, tanto durante o desenvolvimento embrionário, como em tecidos adultos, por exemplo, no controle da homeostase de linfócitos T e B após resposta imune.⁽¹²⁹⁾ Além disso, diversas patologias apresentam a ativação excessiva (ou falta) da via de necroptose como um dos mecanismos de gênese ou progressão da doença. Por exemplo, diversos tipos de câncer possuem expressão diminuída ou ausente de RIPK3 e esta baixa expressão está associada a um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama.⁽¹³⁰⁾ Por outro lado, a inibição da via de necroptose durante pancreatite aguda,⁽¹³¹⁾ infarto do miocárdio,⁽¹³²⁾ isquemia e reperfusão renal,⁽¹³³⁾ diminui

a gravidade destas doenças, sugerindo que o bloqueio da necroptose reduz o componente inflamatório destes processos patológicos.

Vale ainda ressaltar que, recentemente, os genes de RIPK3 e MLKL foram associados à modulação positiva de respostas inflamatórias, por processos que não envolvem a morte das células por um processo lítico. Ambas as moléculas foram descritas como mediadores de ativação do inflamassoma NLRP3 e também da via do *Canonical nuclear fator kappa B* NF- κ B.⁽¹³⁴⁻¹³⁹⁾ Sendo assim, os efeitos da ativação de RIPK3 e MLKL não podem ser exclusivamente associados à morte da célula por necroptose, ainda que, até o momento, os trabalhos demonstrem que os efeitos desta via são preponderantes às demais.

1.4 Morte celular e sepse

Como já mencionado, a sepse é caracterizada por morte massiva de diversos tipos de células, num contexto de exacerbada resposta inflamatória.^(23,33,135, 140-143) Ao longo dos últimos vinte anos diversos artigos científicos foram publicados demonstrando que em modelos murinos de sepse, tanto pela injeção de LPS ou ligação e perfuração cecal (CLP) há a recapitulação destes eventos, ou seja, nestes modelos há uma forte indução de morte celular em células do sistema imune. Isto parece estar associado à imunossupressão induzida pela sepse com consequente falta de resposta adequada à infecção geradora deste quadro e a infecções secundárias.^(83,84,144-146)

Na última década, foi demonstrado em diversos estudos utilizando modelos experimentais e em pacientes que a resposta imunológica no quadro séptico segue um padrão bifásico. O estágio inicial se apresenta de forma 'hiperinflamatória', caracterizada por altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e forte resposta imunológica. O segundo estágio é caracterizado pela atenuação da responsividade de células imunes a estímulos inflamatórios, tal como uma 'imunoparalisia', sendo um período extremamente vulnerável dos pacientes à infecções decorrentes desta imunossupressão.⁽¹⁴⁶⁻¹⁴⁸⁾ O mecanismo para esta paralisia imune parece ter o envolvimento da apoptose, especialmente nos linfócitos.^(149,150) A apoptose foi relacionada com a sepse quando experimentos utilizando a injeção intraperitoneal de bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas*

aeruginosa) em camundongos resultou na morte celular de linfócitos T CD4+ e T CD8+ no timo, sendo que o mesmo foi observado para bactérias Gram-positivas (*Streptococcus pneumoniae*).⁽¹⁵¹⁾ Em modelos CLP, foi mostrado que a apoptose também ocorre em linfócitos do baço, células do parênquima no íleo, cólon, pulmão, músculo esquelético e no rim.⁽¹⁵⁰⁾ E não se demorou muito para ver que tal fenômeno também estava presente em humanos, principalmente em relação aos linfócitos e células epiteliais intestinais.⁽¹⁴⁹⁾ Em um destes estudos utilizando dados laboratoriais de pacientes com sepse, demonstrou-se que a apoptose em pacientes sépticos é mais acelerada do que em pacientes graves sem sepse, e essa apoptose ocorria em linfócitos T circulantes (T CD4+, T CD8+) e linfócitos B (CD19+).⁽¹⁵²⁾ Logo, ficou evidente que a morte por apoptose estava associada a esta perda massiva de células imunes e não-imunes.^(35,84,149) Assim, foi levantada a hipótese de que uma redução nos níveis de apoptose durante a sepse poderia ser uma boa alternativa terapêutica para estes pacientes. Foi então testada a deleção de genes pró-apoptóticos da família Bcl-2, tais como Bid e Bim, em modelos murinos, e se observou a redução dos níveis de morte celular, indicando que, de fato, a apoptose ocorre durante a sepse e pode ser importante para o quadro de imunossupressão apresentado.⁽¹⁴¹⁾ Por outro lado, a redução dos níveis de morte de linfócitos T não foi associada a uma melhora no quadro séptico destes animais.^(153,154)

Sendo assim, é possível que outros tipos de morte celular, principalmente com fenótipo necrótico, estejam também associados ao quadro de sepse ou choque séptico. De fato, existem estudos mostrando que pacientes com sepse cujas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) tinham níveis elevados de piroptose e produção de citocinas pró-inflamatórias eram mais propensos a desenvolver um quadro mais grave.⁽¹⁵⁵⁾ Em modelos murinos de sepse (LPS e CLP), em estágio inicial da sepse foi mostrado que os macrófagos residentes no local da infecção secretam IL-1 β que por sua vez tem como uma de suas funções recrutar os neutrófilos, e logo em seguida, os neutrófilos sofrem piroptose e tornam-se a principal fonte de secreção de IL-1 β , ocasionando um aumento da sinalização para recrutar mais neutrófilos para os locais das infecções.⁽¹⁵⁶⁾ Além disso, animais deficientes em IL-1 β e IL-18, mas não em caspase 1 e caspase 11, são bem mais resistentes ao choque séptico.⁽¹⁵⁷⁾ Ainda, a mesma dicotomia foi vista na injeção de TNF, que é também utilizada como um modelo de quadro inflamatório grave. Em conjunto, estes dados apontam para uma grande relevância das citocinas pro-inflamatórias, que são, a

princípio, produzidas pela ativação de inflamassomas e durante o processo de piroptose.⁽¹⁵⁸⁾ Porém, como a deficiência em caspase-1 e -11 não apresentou o mesmo efeito, é possível que estas citocinas estejam sendo maturadas por outras proteases e em outros contextos, distintos da piroptose, colocando em xeque a real relevância desta via durante a sepse.

Por outro lado, se não central, a ativação de caspases-1 e -11 pode ter um efeito potencializador durante o quadro séptico. Foi demonstrado que o LPS se liga diretamente à caspase-11 e a ativa, o que está associado com uma maior progressão da sepse induzida por bactérias gram-negativas, tais como a *P. aeruginosa*.⁽¹⁵⁵⁾

A necroptose, por sua vez, foi recentemente associada, em modelos murinos, com um pior prognóstico na SIRS induzida por injeção de TNF e também no que se denomina choque hiperagudo, que é induzido por injeção de TNF conjuntamente com inibidores de caspases.⁽¹⁵⁹⁾ Fenômeno semelhante foi encontrado quando se utilizou inibidores específicos para a atividade quinase de RIPK1.^(160,161) A mesma associação também foi encontrada em modelos de CLP e injeção de LPS.⁽¹⁶⁰⁾ Isto foi demonstrado através de camundongos deficientes em RIPK3, que apresentaram redução dos níveis sistêmicos de citocinas pró-inflamatórias e de marcadores de lesão orgânica e lesão pulmonar atenuada, resultando em maior integridade da arquitetura pulmonar, menos morte celular do epitélio pulmonar e diminuição da produção local de citocinas pró-inflamatórias, além de terem infiltração neutrofílica pulmonar e hepática reduzida. Mais importante, em todos estes modelos de sepse a deficiência de RIPK3 reduziu drasticamente as taxas de mortalidade.^(162,163) Assim como RIPK3, MLKL vem sendo associada como fator preditivo de gravidade e mortalidade em pacientes críticos. Um estudo observou que níveis séricos elevados de MLKL em pacientes com sepse após três dias de tratamento na UTI foram preditivos de mortalidade.⁽¹⁶⁴⁾

Porém, até hoje, existem poucos dados que visam associar a morte celular por necroptose a um pior quadro de sepse em humanos. Um estudo realizado recrutou 124 pacientes que foram divididos em três grupos: 43 pacientes com sepse, 39 pacientes com sepse grave e 42 pacientes com choque séptico. Através do plasma desses pacientes e com a técnica de ELISA, foram avaliados os níveis de RIPK3, que estavam significativamente mais altos nos grupos de sepse grave e choque séptico do que no grupo de sepse, assim como os níveis RIPK3 tiveram associação positiva com o

escore SOFA e nível de procalcitonina (PCT). Sendo assim, eles sugerem que os níveis de RIPK3, o escore SOFA e o nível de PCT poderiam, juntos, serem utilizados como biomarcadores para prognóstico de pacientes com sepse.⁽¹⁶⁵⁾ Um outro estudo mostrou dados utilizando a mesma metodologia de se avaliar os níveis plasmáticos de RIPK3, desta vez em uma coorte de 953 pacientes internados em 5 diferentes UTI's localizadas nos EUA e na Coréia.⁽¹⁶⁶⁾ Em todos os hospitais, os pacientes que vieram a óbito apresentaram maiores níveis de RIPK3 no plasma comparado aos pacientes sobreviventes que tiveram alta hospitalar. A relação também foi positiva associada a maiores níveis de RIPK3 no plasma e a disfunção orgânica mais severa em pacientes com sepse e choque séptico.⁽¹⁶⁶⁾ E mais recentemente, utilizando os dados de RIPK3 encontrados no estudo comentado anteriormente, o mesmo grupo mostrou, em uma coorte de 570 pacientes em 3 UTI's diferentes, que níveis mais baixos de TRAIL no plasma foram associados com choque séptico e disfunção orgânica e também ao aumento de RIPK3.⁽¹⁶⁷⁾

Diante do exposto acima, é possível que a ativação da via de necroptose tenha relevância para a gravidade e mortalidade da sepse e que sua inibição possa vir a ser um potencial alvo terapêutico no controle da letalidade do quadro séptico. Porém, até o presente momento, há limitados estudos correlacionando necroptose e sepse em seres humanos. Sendo assim, faz-se necessário investigar se há alteração nos níveis de expressão das moléculas da via de necroptose em células do sangue periférico de pacientes sépticos e avaliar se há uma possível associação entre estes níveis e os diferentes grupos experimentais e/ou gravidade da sepse nos pacientes.

Como este tipo de morte pode potencialmente alterar a celularidade imune e os níveis de inflamação, também são prementes estudos que visam analisar estes parâmetros na nova classificação de pacientes com sepse e correlaciona-los a diferentes níveis de expressão de moléculas envolvidas nas vias de morte celular.

A hipótese estabelecida para esta dissertação é que há associação entre os níveis das moléculas efetoras da via da necroptose e um pior prognóstico e desfecho clínico em pacientes com sepse e choque séptico. Além disso, levantamos a hipótese de que os diferentes grupos experimentais exibem celularidade imune e níveis de mediadores inflamatórios distintos no sangue periférico dos pacientes. Sendo assim, o intuito principal deste projeto é investigar se há um aumento nos níveis das moléculas presentes na via da necroptose e alteração de celularidade imune e níveis

de mediadores inflamatórios no sangue periférico de pacientes com sepse/choque séptico comparado a pacientes controles sem infecção e internados na UTI e controles saudáveis.

1.5 Objetivos

1. Avaliar a relação entre os níveis de RIPK3 e MLKL presentes na via da necroptose em células do sangue periférico e a presença ou não de sepse;
2. Investigar se os níveis de RIPK3 e MLKL podem ser preditivos do grau de gravidade da doença (sepse *versus* choque séptico);
3. Comparar o perfil de citocinas pró- e anti-inflamatórias no plasma dos pacientes sépticos;
4. Analisar por imunofenotipagem o perfil celular dos pacientes com sepse e choque séptico e se é possível diferencia-los entre si e do grupo controle;
5. Analisar a relação entre os níveis de necroptose e os desfechos clínicos dos pacientes.

2 MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos

Anteriormente à coleta dos pacientes, amostras de sangue periférico doadas por indivíduos voluntários foram utilizadas para otimização e treinamento. Após treinamento e otimização, foi dado início às coletas de sangue de indivíduos a serem alocados nos grupos definidos no projeto. Foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para todos os pacientes ou responsáveis pelos pacientes para inclusão no projeto. A equipe de enfermagem da UTI do Hospital ficou designada para coleta da amostra de sangue dos pacientes e pela codificação e anonimização das mesmas. Todas as coletas realizadas foram identificadas por um código de número e dias de coleta (ex: ID: 021-D7), mantendo o estudo de forma cega. O protocolo do estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, sob o número de referência CAAE: 64490117.8.0000.0071.

2.2 Planejamento do estudo

Por se tratar de um estudo piloto e gerador de hipóteses, foi estipulado por conveniência que 20 pacientes de cada grupo seriam o suficiente para mostrar a relevância do estudo.

Este estudo é observacional e prospectivo conduzido na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Israelita Albert Einstein e nos laboratórios do Instituto de Ensino e Pesquisa (IIEP) da Instituição. Os indivíduos elegíveis para este estudo foram pacientes adultos admitidos na UTI do Hospital Israelita Albert Einstein e que apresentavam quadro de sepse ou choque séptico. Os seguintes critérios de exclusão foram considerados: pacientes moribundos, ou que apresentavam insuficiência hepática e/ou hipertensão crâniana. Como grupo controle saudável foram utilizadas amostras de adultos saudáveis recrutados no Hospital, sem doença aguda ativa, e como grupo controle de UTI pacientes sem infecções e internados na UTI. A exclusão de pacientes do estudo ocorreu apenas nos casos de retirada do consentimento por

parte do paciente ou do representante legal. Pacientes podiam deixar o estudo em qualquer momento sem quaisquer consequências. Esperava-se que nem todos os pacientes teriam coletada a série inteira de amostras por diferentes motivos, dentre eles o óbito, alta hospitalar ou por desistência de continuar no projeto. A coleta da série de forma parcial não foi considerada impeditivo para a utilização destas amostras nas análises. Em relação aos integrantes dos grupos controle saudável, foi feita uma única coleta de sangue, assumindo que se o paciente é saudável, ele terá como resultado os mesmos parâmetros analisados em qualquer dia.

2.3 Coleta de dados e amostras

A quantidade de sangue obtida por coleta foi de 20mL, separados em três tubos distintos, dois para coleta de PBMC e granulócitos e um para plasma, RNA e *buffy coat*. Os dados clínicos foram coletados por meio de fichas clínicas eletrônicas e foram inseridos pela equipe do estudo no *REDCap* (ver seção abaixo). Dados demográficos, diagnóstico de admissão no hospital e na UTI, comorbidades, e o índice prognóstico (SAPS III e SOFA) foram coletados na admissão à UTI. Em cada dia de coleta foram coletadas variáveis clínicas e laboratoriais.

Foram coletadas amostras de sangue periférico dos pacientes divididos nos quatro grupos: 1) pacientes diagnosticados com sepse, com coleta nos dias de internação 1 (primeiras 24 horas), 3, 7 e 14; 2) pacientes diagnosticados com choque séptico nestes mesmos dias de coleta; 3) controles internos da UTI sem infecção coletados nos dias 1 e 3; e 4) pacientes controles saudáveis com uma única coleta (Figura 2).

Figura 2. Fluxograma da coleta de sangue periférico dos grupos

2.4 Coleta e armazenamento de dados clínicos

A coleta de dados foi realizada por meio de formulários eletrônicos *Research Electronic Data Capture* (REDCap®, Vanderbilt University, EUA) no Hospital Israelita Albert Einstein. O sistema tem as seguintes funções: registro do paciente, entrada de dados e exportação de dados para análise estatística. Os arquivos eletrônicos foram arquivados no servidor do Hospital Israelita Albert Einstein em um ambiente seguro e controlado para manter a confidencialidade. Os documentos eletrônicos foram controlados com proteção por senha, de acordo com as melhores práticas (Anexo 1).

2.5 Análise estatística

A distribuição contínua dos dados foi avaliada por inspeção visual dos histogramas e pelos testes de normalidade de D'Agostino-Pearson. As características iniciais foram representadas como contagens e porcentagens, médias e desvios-padrão (DP) ou medianas e intervalos interquartis (IQR), quando apropriado.

Os testes de hipóteses têm dois lados com um nível de significância de 5%. O ajuste de Benjamini-Hochberg foi usado para corrigir valores-p para taxa de

descoberta falsa. As análises foram realizadas usando o programa R v.3.4.1 (R Core Team, 2016, Viena, Áustria).

Comparações das condições basais, avaliação diária de pacientes e os resultados clínicos estão apresentados por grupos do estudo e os pacientes com sepse foram comparados aos controles usando o teste exato de Fisher para variáveis categóricas ou teste de soma de postos de Wilcoxon para variáveis contínuas. Os dados também são apresentados e comparados entre pacientes com sepse e choque séptico.

Os dados da quantificação e análises das citocinas, citometria de fluxo, *western blot* e qPCR foram apresentados como médias e desvios-padrão ou mediana e intervalos interquartis. Para as comparações entre os grupos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Também foi utilizado o teste Mann-Whitney para avaliar significância estatística quando comparado somente dois grupos. Como exemplo foram feitas comparações entre os indivíduos controles (controles UTI combinados com os saudáveis) *versus* doentes (pacientes com sepse combinados com os choques sépticos). Para ambos os testes, um valor- $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Para a exclusão dos dados que se diferenciam de forma relevante de todos os outros, levando conseqüentemente a uma interpretação de resultados falsos positivos, utilizamos o método ROUT no próprio *software* Graph Pad® Prism, que possibilita uma análise estratégica que detecta um ou mais *outliers* das amostras. Sendo assim, para todas as análises deste estudo utilizamos o limiar de 0,2% para detecção do que realmente era discrepante e discutimos os dados em cima dos resultados obtidos pós exclusão dos *outliers*. Todas as análises estatísticas dos dados foram feitas no *software* Graph Pad® Prism (versão 7).

2.6 Processamento das amostras de sangue

Foi estabelecido um fluxograma de coleta de amostras de sangue periférico em diferentes tubos, para as diferentes aplicações e testes (Figura 3). O sangue coletado em tubos contendo anticoagulante ACD-A (Sarstedt) foi utilizado para a separação de PBMC e de granulócitos, através de um protocolo adaptado.⁽¹⁶⁸⁾ O

sangue coletado em tubos contendo anticoagulante EDTA K3 (Sarstedt) foi utilizado para a separação de *buffy coat*, plasma e RNA.

2.6.1 Separação das células mononucleares do sangue periférico

O PBMC (células mononucleares de sangue periférico) foi isolado utilizando o reagente Ficoll Premium Plus com densidade de 1.077g/mL (GE Healthcare). O sangue coletado foi centrifugado a 400g durante 40 minutos e a camada superior contendo plasma foi removida. A interface formada pelas células mononucleares foi cuidadosamente transferida por pipetagem para um novo tubo Falcon de 15mL e lavada com PBS (Gibco) por centrifugação a 400g por 10min. O *pellet* de PBMC foi ressuscitado em tampão de lise de cloreto de amônio-potássio (ACK) (Thermo Fisher Scientific) e incubado durante 3 minutos a temperatura ambiente para lisar as hemácias contaminantes na amostra. Seguiu-se o processo de lavagem com PBS para se obter um *pellet* limpo e esbranquiçado sem qualquer contaminante. O número de células e a viabilidade foram determinados usando um contador automatizado de células Countess® Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific). Este equipamento utiliza a coloração por azul de Tripan 0,4% para distinguir células viáveis de células não viáveis.

Um total de 15×10^7 células das amostras de PBMC foram utilizadas para extração proteica através do uso de solução RIPA (Thermo Fisher Scientific), na concentração de 15×10^7 células para 100 μ l de RIPA. O restante das amostras foi colocado em meio de congelamento constituído por 90% soro fetal bovino e 10% Dimetilsulfóxido (DMSO) armazenadas em -80°C. Nos casos onde a amostra apresentou menos que 15×10^7 de células, toda a amostra seguiu para a extração proteica, seguindo a concentração adequada.⁽¹⁶⁸⁾

Com o sedimento do tubo de ACD-A, foi prosseguido o protocolo de separação dos granulócitos com Dextran 6% (GE Healthcare). Brevemente, a este sedimento foi adicionado o Dextran a 6% com incubação por 40min a 37°C. Após o tempo de incubação o sobrenadante, contendo os granulócitos, foi coletado e a amostra submetida a ciclos de lavagem e lise de hemácias até que, visualmente, não houvesse mais contaminante de hemácias (precipitado branco, sem pontos

vermelhos). Em seguida foi feita a contagem celular, extração proteica e criopreservação de células de forma similar ao protocolo de PBMC.^(169,170)

2.6.2 Separação do plasma e das células polimorfonucleares do sangue periférico

Inicialmente, foram retirados 500µL do sangue total para extração do RNA com o Kit RiboPure™-Blood (Invitrogen), que posteriormente seguiu para conversão de cDNA e análise de qPCR.

O restante da amostra foi centrifugada a 400g por 10 minutos, o sobrenadante contendo o plasma foi coletado, aliquotado e preservado em -80°C imediatamente. Estas amostras foram utilizadas para análise de um painel de citocinas, através de um kit de Luminex (Inflammation 20-Plex Human ProcartaPlex™ Panel).

A interface constituída pelas células mononucleares, polimorfonucleares e plaquetas foi cuidadosamente transferida por pipetagem para um novo tubo Falcon de 15mL. Foram realizados ciclos de lavagem com PBS e lise com ACK para eliminação das hemácias. Parte destas amostras foram congeladas para futuro uso (seguindo o mesmo protocolo citado anteriormente) e parte foi utilizada para análise de imunofenotipagem via citometria de fluxo.

Fluxograma do processamento das amostras de sangue coletadas e as diferentes técnicas que serão realizadas nas mesmas.

Figura 3. Delineamento do fluxo de amostras

2.7 Western blot

Para a análise de proteínas, os lisados celulares de PBMC foram quantificados utilizando o Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). As amostras de treinamento e otimização foram quantificadas no espectrofotômetro SpectraMax i3x (Molecular Devices) e as amostras dos pacientes foram quantificadas no espectrofotômetro DXT 880-Multimode Detector (Beckman Coulter).

Para análise de *western blot*, as amostras foram preparadas nas concentrações desejadas pela sua diluição em Tampão de Amostra 6x (200mM Tris HCl pH 6,8, 8% de SDS, 0,4% de bromofenol *blue*, 40% de glicerol contendo 400mM de DTT que é adicionado imediatamente antes do uso). Em seguida, foram fervidas por 5 minutos à 95°C e aplicados em gel de poliacrilamida 10%, que foi corrido à 100V por 75 minutos. Como marcador molecular foi utilizado o Ladder Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards 10–250 kD (BioRad). Posteriormente à corrida, as amostras foram transferidas para membrana de PVDF através de uma corrente de 295mA por 80 minutos em sistema molhado de transferência. Foi realizado o bloqueio com solução de 5% leite em pó desnatado em TBS-T durante 1 hora. Para marcação das proteínas de

interesse, as membranas foram incubadas com anticorpos primários anti- β -actina (clone AC-74, Sigma Aldrich) na proporção de 1:15000, e com o anticorpo anti RIPK1 (clone D94C12, Cell Signaling) na proporção 1:1000, RIPK3 (clone B-2, Santa Cruz) 1:100, MLKL (clone D2I6N, Cell Signaling) 1:2000, GAPDH (MA5-15738, Invitrogen) 1:5000 *overnight*. Após este período, as membranas foram lavadas com tampão TBS-Tween, seguido da incubação com anticorpo secundário anti-mouse.HRP (monoclonal, 7076S Cell Signaling) na concentração de 1:2500 (para membranas incubadas com anti RIPK3), 1:5000 (para membranas incubadas com anti GAPDH) e 1:15.000 (para membranas incubadas com anti - β -actina) para a membrana marcada com anti RIPK1 e anti MLKL a concentração foi de 1:5000 do anticorpo *anti-rabbit* (monoclonal, 7074S Cell Signaling). As bandas foram reveladas com a incubação da membrana em ECL caseiro e visualizadas e documentadas no equipamento ChemiDoc Imaging Systems (Bio-Rad).

2.8 Preparação do reagente quimioluminescente caseiro para western blot

Os reagentes foram: Luminol (250mM em DMSO, armazenado no escuro a -20° C), ácido p-coumárico (90mM em DMSO, armazenado no escuro a -20°C), Peróxido de hidrogênio a 30%, 1M Tris-HCl pH 8,5 e água destilada. Foram identificados dois recipientes (com tampa âmbar) e rotulados de 'A' e 'B'. No primeiro tubo (A), foram adicionadas 1mL da solução de Luminol, 0,44mL de solução de ácido p-coumárico, 10mL de Tris-HCl 1M, pH 8,5 e água destilada até um volume final de 100mL. No segundo tubo (B), foi adicionado 64 μ L de peróxido de hidrogênio, 10mL de Tris-HCl 1M, pH 8,5, e água destilada até um volume final de 100mL. As duas soluções foram armazenadas a 4°C e cobertas com papel alumínio para manter os recipientes fora de exposição à luz. Para o uso, a mistura em proporção 1:1 das soluções A e B é feita na hora.

2.9 Quantificação de citocinas por ensaio de Luminex

Os níveis plasmáticos de 20 citocinas e quimiocinas foram quantificados através do kit Inflammation 20-Plex Human ProcartaPlex™ Panel

(Invitrogen™) e do equipamento xPONENT® 4.2 (Merck Millipore). São elas: sE-Selectina; GM-CSF; ICAM-1 / CD54; IFN alfa; IFN gama; IL-1 alfa; IL-1 beta; IL-4; IL-6; IL-8; IL-10; IL-12p70; IL-13; IL-17A / CTLA-8; IP-10 / CXCL10; MCP-1 / CCL2; MIP-1 alfa / CCL3; MIP-1 beta / CCL4; sP-selectina; TNF alfa. Os dados estão apresentados em mediana, com os intervalos interquartis, já que a maioria das citocinas não exibiu uma curva normal de distribuição entre os pacientes de cada grupo.

Para as análises de agrupamento de dados gerados com os resultados das citocinas, foi realizado um dendograma através do *software* de programação R. Para isso, as citocinas em que os valores apresentaram zero (0) não foram utilizados nessa análise, logo após a exclusão foi realizada para os outros valores a transformação logarítmica para análise estatística. Um número mínimo de citocinas foram selecionadas para posicionar com precisão os pacientes nos subgrupos identificados pelo *software R* e utilizado o teste exato de Fisher para comparação entre os grupos.

2.10 Análise de viabilidade de congelamento das amostras para citometria

Para verificar a pureza e viabilidade celular foi escolhido o método de citometria de fluxo. Como o procedimento do processamento das amostras de sangue é bastante longo, foi feita a avaliação se é possível fazer esta análise com amostras congeladas. Dois processos de descongelamento de amostras foram testados, sendo um utilizando como solução de congelamento HBSS (Gibco) e o outro RPMI 1640 (Gibco) com 30% de soro fetal bovino inativado (Gibco). Para efeitos de comparação também foram analisadas as células logo após o processamento sanguíneo (a fresco). As amostras foram analisadas em citometria de fluxo utilizando um marcador de viabilidade celular - Iodeto de Propídio (PI) e também os anticorpos anti-CD66b FITC (clone G10F5-555724, BD Pharmingen), anti-CD3 APC (clone SK7-340440, BD Pharmingen), anti-CD14 APC-Cy7 (clone MφP9-557831, BD Pharmingen). As células foram adquiridas no citometro LSRFortessa (BD Pharmingen). Os dados foram analisados usando o *software* FlowJo na versão 10 (TreeStar Inc., Ashland, EUA).

2.11 Estratégias de análise de células por citometria de fluxo

Para se avaliar as porcentagens das principais populações imunes, bem como os níveis de morte em cada uma destas populações nas diferentes amostras, foi estabelecido um painel de oito anticorpos combinados com os marcadores de morte celular. A tabela 2 apresenta a especificidade dos anticorpos, seus clones bem como o fluoróforo de cada um deles. Para marcação das células, primeiramente foi realizada a padronização de congelamento, descongelamento e análise das células por citometria de fluxo (Figuras Suplementares 1 e 8). Pós padronização foi utilizada a porção celular do *buffy coat* que estava armazenada em alíquotas no freezer -80°C. As células foram descongeladas em banho-maria a 37°C, ligeiramente por gotejamento ressuspensas em 9mL de RPMI 1640 com 30% de soro fetal bovino inativado em tubo falcon de 15mL e levado para centrifugação a 300g por 10 minutos. Após a centrifugação, as células foram contadas e a sua viabilidade avaliada, da mesma maneira realizada quando preparada para congelamento. Depois da contagem, as células foram transferidas para um novo tubo de FACS (Falcon®) específico para citometria de fluxo e centrifugado por 5 minutos a 200g, após isso foi descartado o sobrenadante e posteriormente adicionado ao *pellet* 100µL do mix de PBS com os anticorpos na diluição/concentração previamente estabelecida e homogeneizadas. As células ficaram por um período de 30 minutos incubadas no escuro a 4°C. Logo após para lavagem das células, elas foram ressuspensas em 500µL de PBS e centrifugadas a 200g por 5 minutos, descartado o sobrenadante. O *pellet* de células foram ressuspensas em tampão de anexina junto com a anexina V e o LiveDead, e então as células foram adquiridas no citometro LSRFortessa (BD) na configuração de 300.000 eventos e analisados com o *software* FlowJo.

Tabela 2. Pannel de anticorpos para diferenciação das principais populações celulares

Painel 1	Clone	Cor
CD19	HIB19	SB416
LiveDead Aqua	Kit	V500
CD4	SK-3	SB600
CD3	OKT3	SB702
Annexin V		FITC
CD14	M5E2	PE
CD16	3G8	PerCP
CD15	HI98	APC
CD56	5.1H11	APC-R700
CD8	RPA-T8	APC-eFluor® 780

2.12 Expressão de RIPK3 e MLKL por qPCR

Para quantificação da expressão de RIPK3, MLKL e IL-1 β das amostras de sangue dos pacientes do estudo, o RNA foi isolado com RiboPure™ RNA Purification Kit, blood (Invitrogen™). O cDNA foi sintetizado pela M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™). A análise da qPCR foi realizada usando o PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Invitrogen™) no termociclador QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR (Applied Biosystems™). Condições iguais de ciclagem foram usadas para amplificar genes de interesse: RIPK3, MLKL e IL-1 β e os genes de referência: GAPDH e β -actina. As condições de temperatura dos ciclos foram configuradas da seguinte maneira: 1) *Hold stage* - um ciclo de 2 minutos por 50°C e 10 minutos por 95°C; 2) *PCR stage*: 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto; 3) *Melt curve stage*: 1 ciclo de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos. A análise da curva de *melting* foi utilizada para confirmar a amplificação específica do produto. Para as análises dos genes de interesse foi utilizada a normalização da média geométrica dos genes de referência. As seguintes sequências de *primers* foram utilizados para análise de qPCR:

Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para os ensaios de qPCR

hGAPDH RV	CCATGTTTCGTCATGGGTGTGAACCA
hGAPDH FW	CACGATACCAAAGTTGTCATGGA
hACTB RV	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
hACTB FW	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC
hRIPK3 RV	GGCAAGGCAGTTGTCTGTTG
hRIPK3 FW	CCAAATCCAGTAACAGGGCG
hMLKL RV	TCCCAGAGGACGATTCCAAA
hMLKL FW	TCCAGATGCTAAGAAGAGATAATGA

2.13 ELISA do RIPK3

Para a determinação quantitativa das concentrações RIPK3 contidas no plasma dos grupos experimentais, utilizamos um kit de ensaio imunoadsorvente ligado a enzima (ELISA) de RIPK3 (CUSABIO-EL019737HU). O plasma proveniente das amostras de sangue do tubo de EDTA seguiu da mesma maneira que foi realizada na quantificação das citocinas por Luminex. O ensaio de ELISA de RIPK3 foi feito de acordo com as instruções do fabricante.

2.14 Cinética de morte celular

Para o estabelecimento de controles positivos para os parâmetros de morte celular, foram utilizadas as células HT-29 e HeLa, que são documentadas como sensíveis a estímulos apoptóticos e necroptóticos. Tanto HT-29 quanto HeLa foram cultivadas em meio DMEM-*high glucose* (Invitrogen) enriquecido com soro fetal bovino (Gibco) e os antibióticos penicilina e streptomicina (Invitrogen).

Para a indução de morte celular, as células HT-29 e HeLa foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de 1×10^5 células/poço. Após 24h ambas as células foram tratadas com TNF (R&D), z-VAD (APExBIO) e cicloheximida (CHX), nas seguintes combinações, sempre com a adição de SytoxGreen (Invitrogen™) que é um marcador de viabilidade celular: 1) 50nM SYTOX® Green; 2) 10ng/mL hTNF + 20μM zVAD + 50nM SYTOX® Green; 3) 10ng/mL mTNF + 20μM zVAD + 25μM CHX + 50nM SYTOX® Green e 4) 10ng/mL hTNF + 20μM zVAD + 25μM CHX + 50nM SYTOX® Green.

Imediatamente após o tratamento, a placa foi incubada a 37°C, 5% CO₂ no equipamento IncuCyte ZOOM (Essen BioScience), programado para tirar fotos de 4 campos diferentes de cada poço tratado, a cada 45 minutos por um total de 24h. Dessa forma é possível acompanhar por meio de imagens e vídeos o tempo de incorporação do SytoxGreen, que é um intercalante de DNA, ou seja, nos indica quando a célula perdeu sua integridade de membrana. Além da incorporação deste reagente, é possível observar também a morfologia das células conforme essas vão morrendo, podendo indiretamente diferenciar a apoptose da necroptose.

2.15 Treinamento e otimização dos protocolos para obtenção e análise das células.

O treinamento e otimização dos protocolos realizados neste projeto estão descritos no Anexo 2. Em resumo, ambos foram bem sucedidos e essenciais para o bom andamento do projeto.

3 RESULTADOS

3.1 Dados demográficos dos grupos experimentais

Inicialmente, para comparação mais geral entre as características dos grupos controles e os com qualquer quadro séptico, os grupos sepse e choque séptico foram unificados. A tabela 4 mostra a distribuição geral de parâmetros clínicos dos participantes, separados nestes três grupos. Em relação à idade, a média dos pacientes no grupo sepse foi de 72 anos, no grupo controle interno da UTI foi de 56 anos e no grupo voluntários saudáveis foi de 28 anos. Em relação ao sexo dos indivíduos 42,5% dos participantes com sepse, 75% dos pacientes controles da UTI e 40% dos indivíduos saudáveis eram homens. O tipo de admissão foi dividido em cirúrgico e clínico. Trinta e nove pacientes com quadro de sepse foram admitidos por motivo clínico, sendo somente um paciente por motivo cirúrgico enquanto no grupo controle interno da UTI, dez pacientes foram internados por motivos cirúrgicos e dez pacientes por motivos clínicos. Não houve diferença estatística entre os grupos controle UTI e sepse em relação à presença de qualquer das comorbidades enquanto que para os scores SOFA e SAPS III houve diferença estatística. Nenhum dos pacientes do grupo controle UTI foi submetido a tratamento com antibiótico, reforçando a inexistência de infecção neste grupo.

Em seguida, foram feitas as comparações diretas entre o grupo sepse e o grupo choque séptico, cujos dados estão compilados na tabela 5. Tanto o parâmetro gênero como o parâmetro idade não apresentaram diferença estatística significativa. O local mais frequente de infecção entre os pacientes com sepse foi o trato respiratório (55%) e nos casos de choque séptico foi infecções abdominais (40%), com $p < 0,007$. A média de score SOFA nos pacientes com sepse foi de 3 e dos pacientes com choque séptico foi de 8 com $p < 0,001$. Da mesma forma, a média do score SAPS III foi maior em pacientes com choque séptico do que nos com sepse, sendo respectivamente 63 e 49, $p < 0,006$. Em relação à disfunção orgânica, houve uma incidência significativamente maior no grupo choque séptico de problemas cardiovasculares se comparado com o grupo sepse. Para as outras disfunções orgânicas, presença de comorbidades, número de antibióticos ministrados, quantidade

de fluido e cristaloides infundidos, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

Em relação aos desfechos clínicos, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos de sepse e choque séptico, exceto na variável de tempo de internação ($p < 0,013$), sendo que os pacientes com choque séptico permanecem em média três dias e pacientes com sepse um dia (Tabela 6).

Na coorte dos pacientes com sepse, os locais primários de infecção mais comuns foram pulmão (35%), abdômen (25%), seguidos de rim (15%), trato urinário (10%) e sanguínea (7,5%). Ao comparar os dois grupos, há diferença estatística em relação ao sítio de infecção, sendo que há uma preponderância de casos de pneumonia em pacientes do grupo sepse (55%) e de infecção abdominal no grupo de choque séptico (40%) (Tabela 6). Em ambos os grupos, os agentes etiológicos mais comuns nas infecções foram causados por bactérias Gram-negativa, como *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*. No entanto, o tipo de infecção e as infecções confirmadas por exames microbiológicos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Tabela 7).

Tabela 4. Características demográficas dos grupos experimentais

	Sepse (N=40)	Controle N=20	Voluntários saudáveis (n=20)	Valor-p
Anos, idade	72 (62-84)	56 (48-69)	28 (24-36)	0,004
Sexo masculino	17 (42,5)	15 (75,0)	8 (40,0)	0,027
BMI, Kg/m ²	27,9 (25,1-29,8)	25,9 (25,6-29,1)	25,1 (22,4-26,5)	0,719
Tipo de admissão				
Cirúrgico	1 (2,5)	10 (50,0)	---	<0,001
Clínico	39 (97,5)	10 (50,0)		
Motivo de admissão				
Cirurgia eletiva	0 (0,0)	10 (50,0)		---
Cirurgia de emergência	0 (0,0)	0 (0,0)		---
Monitoração	0 (0,0)	2 (10,0)		---
Sepse	20 (50,0)	0 (0,0)	---	
Choque séptico	20 (50,0)	0 (0,0)		---
Outro tipo de choque	0 (0,0)	4 (20,0)		---
Insuficiência cardíaca	0 (0,0)	1 (5,0)		---
Abdominal aguda	0 (0,0)	1 (5,0)		---
Outros	0 (0,0)	2 (10,0)		
Comorbidades				
Hipertensão	22 (55,0)	9 (45,0)		0,585
Diabetes mellitus	16 (40,0)	5 (25,0)		0,389
DPOC	6 (15,0)	0 (0,0)		0,165
Câncer	10 (25,0)	3 (15,0)		0,512
AIDS	0 (0,0)	0 (0,0)	---	---
Imunossupressão	1 (2,5)	1 (5,0)		0,999
Consumo de álcool	0 (0,0)	2 (10,0)		0,107

continua...

...continuação					
Insuficiência cardíaca	11 (27,5)	2 (10,0)			0,185
Doença renal crônica	7 (17,5)	0 (0,0)			0,083
Outras	9 (22,5)	2 (10,0)			0,306
Sítio de infecção					
Pneumonia	14 (35,0)				
Urinário	4 (10,0)				
Pielonefrite	6 (15,0)	---	---		
Abdômen	10 (25,0)				
Infecção da corrente sanguínea	3 (7,5)				
Outros	3 (7,5)				
SAPS III	56 (45-67)	27 (25-39)	---		<0,001
SOFA	5 (3-8)	2 (0-3)	---		<0,001
qSOFA					
Hipotensão	28 (70,0)	---	---		
Taquipnéia	20 (50,0)				
Depressão do nível de consciência	16 (40,0)				
Disfunção orgânica					
Cardiovascular	31 (77,5)				
Hepática	2 (5,0)				
Metabólica	24 (60,0)				
Hematológica	4 (10,0)	---	---		
Renal	14 (35,0)				
Coagulação	12 (30,0)				
Pulmonar	33 (82,5)				
Neurológica	15 (37,5)				
Lactato, mg/dL	20,5 (13,0-29,2)	22,4 (16,2-26,7)	---		0,890
Tratamento inicial					
Antibiótico					
Ceftriaxona	18 (45,0)				
Meropenem	9 (22,5)	---	---		
Piperacilina/Tazobactam	13 (33,4)				
Clarithromicina	11 (27,5)				
Clindamicina	4 (10,0)				
Metronidazol	5 (12,5)				
Teicoplanina	5 (12,5)				
Vancomicina	4 (10,0)				
Outros	5 (12,5)				
Número de antibióticos	2 (1-2)	0 (0,0)	---		---
Recebeu 30mL/kg de cristaloides	30 (85,7)	---	---		
Quantidade total de fluidos recebida, mL	2000 (1000-2000)	---	---		

uma Comparação entre sepse e controle. IMC: Índice de massa corporal; doença pulmonar obstrutiva crônica; SAPS: Simplified Acute Physiology Score; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment. Características demográficas dos participantes separados em três grupos (Controles Saudáveis, Controles UTI e com Quadro Séptico) O número em parêntesis indica o intervalo interquartil para as variáveis contínuas e o percentual para variáveis categóricas.

Tabela 5. Tabela demográfica dos pacientes com sepse e choque séptico

	Choque séptico (N=20)	Sepse N=20	Valor-p
Anos, idade	74 (62-84)	71 (60-84)	0,645
Sexo masculino	10 (50,0)	13 (65,0)	0,523
BMI, Kg/m ²	29,0 (26,0-26,7)	27,2 (24,8-30,4)	0,808
Tipo de admissão			
Cirúrgico	0 (0,0)	1 (5,0)	0,311
Clínico	20 (100,0)	19 (95,0)	
Comorbidades			
Hipertensão	11 (55,0)	11 (55,0)	0,999
Diabetes mellitus	6 (30,0)	10 (50,0)	0,333
DPOC	4 (20,0)	2 (10,0)	0,661
Câncer	6 (30,0)	4 (20,0)	0,716
AIDS	0 (0,0)	0 (0,0)	---
Imunossupressão	0 (0,0)	1 (5,0)	0,999
Consumo de álcool	0 (0,0)	0 (0,0)	---
Insuficiência cardíaca	7 (35,0)	4 (20,0)	0,480
Doença renal crônica	5 (25,0)	2 (10,0)	0,407
Outras	5 (25,0)	4 (20,0)	0,999
Fonte de infecção			
Pneumonia	3 (15,0)	11 (55,0)	0,007
Urinária	3 (15,0)	1 (5,0)	
Pielonefrite	3 (15,0)	3 (15,0)	
Abdômen	8 (40,0)	2 (10,0)	
Infecção da corrente sanguínea	3 (15,0)	0 (0,0)	
Outros	0 (0,0)	3 (15,0)	
SAPS III	63 (52-75)	49 (41-57)	0,006
SOFA	8 (5-8)	3 (2-3)	<0,001
qSOFA			
Hipotensão	18 (90,0)	10 (50,0)	0,013
Taquipnéia	10 (50,0)	10 (50,0)	0,999
Depressão do nível de consciência	11 (55,0)	5 (25,0)	0,105
Disfunção orgânica			
Cardiovascular	19 (95,0)	12 (60,0)	0,019
Hepática	2 (10,0)	0 (0,0)	0,487
Metabólica	13 (65,0)	11 (55,0)	0,747
Hematológica	2 (10,0)	2 (10,0)	0,999
Renal	10 (50,0)	4 (20,0)	0,095
Coagulação	9 (45,5)	3 (15,0)	0,082
Pulmonar	16 (80,0)	17 (85,0)	0,999
Neurológica	10 (50,0)	17 (85,0)	0,190
Lactato, mg/dL	21 (19-28)	19 (13-30)	0,956
Tratamento inicial			
Antibiótico			
Ceftriaxona	5 (25,0)	13 (65,0)	0,009
Meropenem	8 (40,0)	1 (5,0)	
Piperacilina/Tazobactam	6 (30,0)	7 (35,0)	
Clarithromicina	4 (20,0)	7 (35,0)	
Clindamicina	0 (0,0)	4 (20,0)	
Metronidazol	3 (15,0)	2 (10,0)	
Teicoplanina	5 (25,5)	0 (0,0)	
Vancomicina	3 (15,0)	1 (5,0)	
Outros	4 (20,0)	1 (5,0)	
Número de antibióticos	2 (2-2)	2 (2-2)	0,838
Recebeu 30mL/kg de cristalóides	15 (75,0)	15 (75,0)	0,999

continua...

...continuação

Quantidade total de fluidos recebida, mL	2000 (1125-2500)	1000 (1000-2075)	0,402
--	---------------------	------------------	-------

IMC: índice de massa corporal; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; SAPS: Simplified Acute Physiology Score. Tabela demográfica das características dos pacientes com sepse e choque séptico. O número em parêntesis indica o intervalo interquartil para as variáveis contínuas e o percentual para variáveis categóricas.

Tabela 6. Desfecho clínico dos grupos experimentais com sepse

	Choque séptico (N=20)	Sepse N=20	Valor-p
Mortalidade na UTI	1 (5,0)	0 (0,0)	0.999
Mortalidade hospitalar	1 (5,0)	0 (0,0)	0.999
Mortalidade em 28 dias	1 (5,0)	0 (0,0)	0.999
Tempo de permanência na UTI	3 (2-4)	1 (1-2)	0,013
Tempo de permanência hospitalar	11 (7-16)	7 (5-9)	0,082

UTI: Unidade de terapia intensiva. Desfechos clínicos de acordo com o tipo de sepse. O número em parêntesis indica o intervalo interquartil para as variáveis contínuas e o percentual para variáveis categóricas.

Tabela 7. Características do tipo de infecção

	Sepse (sepse + choque séptico) (N=40)	Choque séptico (N=20)	Sepse N=20	Valor-p
Fonte de infecção				
Pneumonia	14 (35,0)	3 (15,0)	11 (55,0)	0,007
Urinária	4 (10,0)	3 (15,0)	1 (5,0)	
Pielonefrite	6 (15,0)	3 (15,0)	3 (15,0)	
Abdômen	10 (25,0)	8 (40,0)	2 (10,0)	
Corrente sanguínea	3 (7,5)	3 (15,0)	0 (0,0)	
Prótese articular	1 (2,5)	0 (0,0)	1 (5,0)	
Outras	2 (5,0)	0 (0,0)	2 (10,0)	
Tipo de infecção				
Comunidade	29 (72,5)	14 (70,0)	15 (75,0)	0,716
Adquirida no hospital	10 (25,0)	6 (30,0)	4 (20,0)	
Relacionadas ao cuidado da saúde	1 (2,5)	0 (0,0)	1 (5,0)	
Infecção confirmada por microbiologia	15 (37,5)	9 (45,0)	6 (30,0)	0,514
Tipo de culturas				
Sangue	39 (97,5)	20 (100,0)	19 (95,0)	0.999
Traqueal	3 (7,5)	3 (15,0)	0 (0,0)	0,230
Urina	24 (60,0)	11 (55,0)	13 (65,0)	0,747
Líquido cefalorraquidiano	1 (2,5)	1 (5,0)	0 (0,0)	0.999
Outros	7 (17,5)	3 (15,0)	4 (20,0)	0.999
Microrganismo (em 83 culturas de sangue)				
Negativo	61	30	31	
<i>Escherichia coli</i>	10	06	04	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	02	00	01	
<i>Staphylococcus aureus</i>	02	02	00	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	01	00	01	
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	02	02	00	
Microrganismo (em 03 culturas traqueais)				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	01	01	00	

continua...

...continuação			
<i>Staphylococcus aureus</i>	01	01	00
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	01	01	00
Microrganismo (em 01 cultura LCR)			
Negativo	01	01	00
Microrganismo (em 24 culturas de urina)			
Negativo	14	05	09
<i>Escherichia coli</i>	07	04	03
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	02	01	01
Cândida albicans	01	01	00
Citrobacter koseri	01	01	00
Microrganismo (em 07 outras culturas)			
Negativo	06	03	03
<i>Enterococcus faecalis</i>	01	00	01

^{uma} Comparação entre choque séptico e sepse. LCR: líquido cefalorraquidiano. Características do tipo, fonte e espécie dos agentes etiológicos. O número em parêntesis indica o intervalo interquartil para as variáveis contínuas e o percentual para variáveis categóricas.

3.2 Coleta das amostras dos pacientes

Uma vez finalizados os processos de otimização e treinamento (Anexo 3), foi dada a autorização para a equipe médica e multiprofissional para obter a assinatura dos TCLEs (Anexo 1) e coletar as amostras dos pacientes que poderiam ser incluídos em qualquer um dos nossos grupos de estudo. Vale ressaltar que o estudo foi cego e, portanto, não houve a transmissão de informações sobre qual estado de saúde e à qual grupo experimental aquele sujeito pertence. Assim que as amostras eram coletadas, imediatamente recebiam uma codificação, que foi a única forma utilizada para sua identificação durante a análise dos resultados.

Nenhum paciente foi excluído do estudo e, portanto, no dia 0 foram coletadas 80 amostras. Já no dia 3, no qual estavam previstas coletas de 60 amostras, somente 41 amostras (68,3%) foram coletadas. Para os dias 7 e 14 eram previstas 40 coletas, sendo que no dia 7 foram coletadas 19 amostras e no dia 14 somente 3, totalizando 47,5% e 7,5%, respectivamente (Figura 4).

Porcentagem de coletas realizadas para cada período em relação ao total previsto de coletas.

Figura 4. Relação do número e da porcentagem das coletas realizada no projeto

Como pode ser visto, em âmbito geral, obtivemos sucesso na obtenção e preservação da viabilidade das populações (Figura 5 e Tabela do Apêndice 1). Em algumas delas, porém, a quantidade de células ficou aquém do desejado, principalmente pela coleta de um volume menor de sangue (Tabela Apêndice 1). Para estas amostras, demos prioridade para a confecção das amostras de *western blot*.

(A) Média do número de células pós processamento dos pacientes no dia 0, dia 3, dia 7 e dia 14.
 (B) Média da viabilidade celular de todas as amostras de sangue periférico processadas durante o projeto.

Figura 5. Representação da média de número de células e viabilidade pós processamentos de todos os pacientes

3.3 Análise da proteína C-reativa

A proteína C reativa (PCR) é um importante biomarcador de estado inflamatório. Sendo assim, utilizamos os dados da PCR dos pacientes para os quais foram pedidos este exame para confirmar o estado inflamatório dos pacientes com sepse. Como esperado, os dados apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos controle UTI *versus* sepse e controle UTI *versus* choque séptico, sendo possível associar o aumento da PCR em pacientes em quadro séptico. Vale ainda destacar que não houve diferença entre os grupos sepse e choque séptico (Figura 6). Outro resultado importante acerca da PCR é dado que somente um paciente veio a óbito de nossa coorte, não foi possível associar este parâmetro com a mortalidade destes pacientes.

A concentração da PCR apresentou o valor-p <0,05 entre controle UTI *versus* sepse e controle UTI *versus* choque séptico.

Figura 6. Análise da proteína C reativa do dia 0
Análise do dia 0 da concentração da PCR através do hemograma comparando os grupos: controle UTI (n:07), sepse (n:18) e choque séptico (n:17)

3.4 Hemograma dos grupos experimentais

É sabido que os leucócitos são de extrema importância durante o processo da sepse, sendo o hemograma o primeiro exame clínico para detectar alguma alteração e assim diagnosticar uma possível infecção nestes pacientes.

Sendo assim, após cada uma das coletas dos grupos controle UTI, sepse e choque séptico foi feito um hemograma para obter as frequências e quantidades das diferentes séries de células presentes no sangue periférico, a fim de verificar se há diferença entre os grupos do estudo.

No dia 0, não encontramos diferenças estatisticamente significativas no número de leucócitos totais entre os grupos, apesar de parecer haver uma tendência de diminuição nos grupos com sepse ou choque séptico se comparados ao grupo controle UTI (Figura 7A). No dia 3 (Figura 7B) e no dia 7 (Figura 7C) não houve diferença entre os grupos em relação ao número total de leucócitos.

Análise dos leucócitos totais através do hemograma dos grupos: controle UTI, sepse e choque séptico nos dias: (A) dia 0, (B) dia 3 e (C) dia 7. Cada ponto demonstrado nos gráficos A, B e C representa um indivíduo e os dados foram representados em mediana e intervalo interquartil, aplicado o teste de Kruskal-Wallis quando três grupos e Mann-Whitney quando dois grupos. Não encontramos alterações significativas quando os grupos foram comparados.

Figura 7. Análise dos leucócitos dos dias: 0, 3 e 7

Em contraste, foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos em relação aos linfócitos totais no dia 0. Na figura 8A, é possível observar que a porcentagem de linfócitos totais está diminuída no grupo choque séptico em relação aos outros dois grupos. Já em termos de contagem absoluta por microlitro de sangue, a diferença foi observada entre os dois grupos sépticos em relação ao grupo controle UTI (Figura 8B).

Quando os pacientes de sepse e choque séptico foram agrupados em um único grupo e comparados com o grupo controle UTI, ficou ainda mais evidente a diferença entre o grupo controle e os pacientes sépticos (Figuras 8C, D).

(A-B) Análise do dia 0 da porcentagem (A) e número dos linfócitos totais por μL (B) através do hemograma comparando os grupos controle UTI, sepse e choque séptico. (C-D). Análise do dia 0 da porcentagem (C) e número dos linfócitos totais por μL (D) através do hemograma agrupando os pacientes de sepse e choque séptico em um único grupo e comparando-o com os controles UTI. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

Figura 8. Hemograma dos linfócitos totais no sangue do dia 0 de coleta

Analizamos também outra subpopulação de grande importância no cenário da sepse, que são os neutrófilos. Na comparação entre os grupos, tanto usando o parâmetro porcentagem como contagem absoluta, a única diferença estatisticamente relevante observada foi no aumento discreto na porcentagem de neutrófilos nos pacientes em choque séptico se comparados com os controles UTI (Figuras 9A e 9B). É possível notar uma tendência de aumento também no grupo sepse em comparação ao grupo controle, porém sem confiança estatística. Quando agrupamos sepse e choque séptico em um único grupo, confirmou-se o aumento na porcentagem de neutrófilos nos pacientes sépticos (Figura 9C). Vale ressaltar que não houve diferença na contagem absoluta de neutrófilos entre os grupos (Figura 9D).

Análise por hemograma dos neutrófilos totais no sangue do dia 0 de coleta. (A-B) Análise do dia 0 da porcentagem (A) e número dos neutrófilos totais por μL (B) através do hemograma comparando os grupos controle UTI, sepse e choque séptico. (C-D). Análise do dia 0 da porcentagem (C) e número dos neutrófilos totais por μL (D) através do hemograma agrupando os pacientes de sepse e choque séptico em um único grupo e comparando-o com os controles UTI. ** $p < 0,01$.

Figura 9. Análise dos neutrófilos do dia 0

3.5 Análise das populações celulares por citometria de fluxo

Apesar dos dados obtidos por hemograma serem importantes para a análise das possíveis alterações nos componentes celulares do sangue periférico, optamos por fazer uma análise mais aprofundada destas populações através da técnica de citometria de fluxo. Após exclusão de debris celulares e *doublets* (Figura Suplementar 1), os leucócitos foram classificados em seguintes subpopulações: linfócitos T (totais, CD4+ ou CD8+), linfócitos B, células NKT (totais, CD4+ ou, CD8+), neutrófilos, monócitos (totais, clássicos ou intermediários) e células NK (totais, CD56^{dim}CD16^{bright}, CD56^{dim}CD16⁻, CD56-CD16^{bright}). A estratégia de *gating* aplicada para detecção de cada tipo celular por citometria de fluxo está representada na tabela 8.

Tabela 8. Estratégia de análise para diferenciação das principais populações celulares

População	Passo 1	Passo 2	Passo 3	Passo 4
Linfócitos B	CD3- x CD19+	A x LD		
Linfócitos T	CD3+ x CD19-	A x LD		
CD4+ T- <i>helper</i>	CD3+ x CD19-	CD56- x CD16-	CD4+ x CD8-	A x LD
CD8+ T-citotóxico	CD3+ x CD19-	CD56- x CD16-	CD4- x CD8+	A X LD
NKT total	CD3+ x CD19-	CD56+ x CD16-		
NKT CD4+	CD3+ x CD19-	CD56+ x CD16-	CD4+ x CD8-	A x LD
NKT CD8+	CD3+ x CD19-	CD56+ x CD16-	CD4- x CD8+	A x LD
Neutrófilos	CD3- x CD19-	CD15+ x CD14-	A x LD	
Monócitos clássicos	CD3- x CD19-	CD15- x CD14+	CD14+ x CD16-	A x LD
Monócitos intermediários	CD3- x CD19-	CD15- x CD14+	CD14+ x CD16+	A x LD
NK CD56 ^{dim} CD16 ^{bright}	CD3- x CD19-	CD15- x CD14-	CD16 ^{dim} x CD56 ^{brite}	A x LD
NK CD56 ^{bright} CD16-	CD3- x CD19-	CD15- x CD14-	CD16- x CD56 ^{bright}	A x LD
NK CD56-CD16 ^{bright}	CD3- x CD19-	CD15- x CD14-	CD16 ^{bright} x CD56-	A x LD

A x LD: Anexina x LiveDead.

Como explicitado na tabela 8, a identificação dos linfócitos B foi feita através da marcação positiva para CD19 e negativa para CD3. Quando comparadas as porcentagens destas células nos diferentes grupos, não foi possível observar diferença estatística, mesmo quando os pacientes com sepse e choque séptico foram agrupados em um mesmo grupo e comparados com o controle UTI (Figura 10).

(A) Gráfico representativo de *gating* para identificação dos linfócitos B, levando em consideração a expressão de CD3 *versus* CD19. (B) comparação da porcentagem de linfócitos B entre os grupos controle, sepse e choque séptico. (C) comparação da porcentagem de CD19+ entre os grupos controle e pacientes com quadro séptico (sepse + choque séptico). Em ambas as análises não houve diferença estatística.

Figura 10. Análise da porcentagem de linfócitos B nos diferentes grupos experimentais no dia 0

Em relação aos linfócitos T (CD3+CD19-CD16-CD56-), também não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, mesmo quando separados em linfócitos T *helper* (CD4+) e citotóxicos (CD8+) (Figura 11). Da mesma forma, não foi observada diferença quando os pacientes com sepse e choque séptico foram agrupados e comparados com o grupo controle UTI (Figura 11).

(A) Gráfico representativo de *gating* para identificação dos linfócitos T, levando em consideração a expressão de CD3 versus CD19. (B) Gráfico representativo de *gating* levando em consideração a expressão de CD16 versus CD56. (C-D) Gráfico representativo de *gating* levando em consideração a expressão de CD4 versus CD8. (E à G) comparação da porcentagem de linfócitos CD3, CD4 e CD8 entre os grupos controle, sepse e choque séptico. (H à J) comparação da porcentagem de CD3, CD4 e CD8 entre os grupos controle e pacientes com quadro séptico (sepse + choque séptico). Em ambas as análises não houve diferença estatística.

Figura 11. Análise da porcentagem de linfócitos T nos diferentes grupos experimentais no dia 0

As células NKT (CD3+CD19-CD16-CD56+) podem ser analisadas como um grupo único ou ser subdivididas em populações distintas, sendo as mais importantes as que expressam CD4+ (CD3+CD19-CD16-CD56+CD4+CD8-) ou CD8+ (CD3+CD19-CD16-CD56+CD4-CD8+) (Figura 12). Quando analisado se há diferenças nas porcentagens destas populações celulares entre os grupos experimentais, é possível observar uma diferença estatística que aponta para uma maior porcentagem de NKT total nos pacientes sépticos comparados aos pacientes controles (Figura 12E), sendo que esta diferença é explicada majoritariamente pelas diferenças encontradas para a subpopulação NKT CD4+ (Figura 12F), já que apesar da tendência ser a mesma, não foi possível determinar significância estatística para as NKT CD8+ (Figura 12G).

Nas análises com os grupos separados entre controle, sepse e choque séptico, é possível perceber que a diferença vista anteriormente é em grande parte contida nos pacientes com sepse e não choque séptico, já que há diferença

estatística entre os pacientes com sepse mas não com choque séptico quando comparados com o grupo controle (Figuras 12H, 12I, 12J). Estes dados sugerem que as porcentagens de NKT CD4+ podem ser utilizadas para se diferenciar, no dia 0, um paciente com sepse de um paciente controle.

(A) Gráfico representativo de *gating* para identificação das células NKT, levando em consideração a expressão de CD3 versus CD19. (B) Gráfico representativo de *gating* levando em consideração a expressão de CD16 versus CD56. (C-D) Gráfico representativo de *gating* levando em consideração a expressão de CD4 versus CD8. (E à G) comparação da porcentagem de NKT CD4 e NKT CD8 entre os grupos controle, sepse e choque séptico. (H à J) comparação da porcentagem de NKT CD4 e NKT CD8 entre os grupos controle e pacientes com quadro séptico (sepse + choque séptico). * p<0,05. **p<0,01.

Figura 12. Análise da porcentagem de NKT nos diferentes grupos experimentais no dia 0

Para identificação dos fenótipos das células NK foram utilizadas as estratégias de *gating* já descritas anteriormente na tabela 8: NK CD56^{bright} (CD16-CD3-CD19-CD15-CD14-CD16-CD56^{bright}), NK CD56^{dim}CD16^{bright} (CD3-CD19-CD15-CD14-CD16^{bright}CD56^{dim}), NK CD56-CD16^{bright} (CD3-CD19-CD15-CD14-CD16^{bright}CD56-) ou a soma destas três populações, indicando NK total (Figura 13). É possível observar diferenças estatisticamente significativas de NK total quando se compara o grupo controle com os pacientes com sepse e choque séptico agrupados (Figura 13I). Quando separados em dois grupos, somente o grupo de choque séptico mantém diferença estatisticamente significativa quando comparada com o controle,

apresentando menor quantidade de porcentagem de NK total circulantes no sangue periférico (Figura 13M).

Para entender qual subpopulação de NK seria a responsável pelas diferenças observadas, fizemos a análise para cada fenótipo. As células NK CD56^{bright}CD56- não apresentaram diferença estatística entre controle *versus* sepse e entre os grupos, quando os pacientes foram separados em sepse e choque séptico (Figuras 13G e 13K).

As subpopulação de células NK CD56^{dim}CD16^{bright} apresentaram o mesmo padrão encontrado quando as NKs são analisadas em sua totalidade, ou seja, quando agrupados, os pacientes com quadro séptico apresentam diferença estatística comparados com o grupo controle, sendo que esta diferença se mantém somente na comparação entre o grupo choque séptico e controle, quando os pacientes são separados (Figuras 13H e 13L).

Talvez o dado mais interessante seja em relação às células NK CD56-CD16^{bright}. Nesta subpopulação, a comparação entre o grupo controle e os pacientes com quadro séptico apresenta um p bastante significativo ($P < 0,0001$). Mais importante, na comparação entre os três grupos, além de existir diferença entre o grupo choque séptico e controle (como visto para NK total e NK CD56^{dim}CD16^{bright}), é possível verificar diferenças entre os grupos com sepse (Figuras 13I e 13M).

(A) Gráfico representativo de *gating* para identificação das células NK, levando em consideração a expressão de CD3 *versus* CD19. (B) Gráfico representativo de *gating* levando em consideração a expressão de CD14 *versus* CD15. (C à E) Gráfico representativo de *gating* levando em consideração a expressão de CD16 *versus* CD56. (F à I) comparação da porcentagem de NK, NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}CD16^{bright} e NK CD56-CD16^{bright} entre os grupos controle, sepse e choque séptico. (J à M) comparação da porcentagem de NK, NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}CD16^{bright} e NK CD56-CD16^{bright} entre os grupos controle e pacientes com quadro séptico (sepse + choque séptico). * p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001. ****p<0,0001.

Figura 13. Análise da porcentagem de NK nos diferentes grupos experimentais no dia 0

Em relação aos monócitos, foi possível analisar a população de monócitos clássicos, de monócitos intermediários e também de monócitos totais (Figura 14). A análise dos monócitos totais indica que existem diferenças estatísticas quando comparados os grupos controle e os pacientes com quadro séptico (Figura 14E) e entre os grupos choque séptico e controle (Figura 14H), indicando que os pacientes com choque séptico possuem uma menor frequência desta população em seu sangue periférico.

Quando analisadas as subpopulações, os monócitos intermediários não apresentaram diferença estatística em nenhuma comparação (Figuras 14F e 14I).

Já os monócitos clássicos recapitularam as diferenças vistas na análise dos monócitos totais e, provavelmente, são os responsáveis pelas mesmas (Figuras 14G e 14J).

(A) Gráfico representativo de *gating* para identificação dos monócitos, levando em consideração a expressão de CD3 *versus* CD19. (B) Gráfico representativo de *gating* levando em consideração a expressão de CD14 *versus* CD15. (C à D) Gráfico representativo de *gating* levando em consideração a expressão de CD16 *versus* CD14. (E à G) comparação da porcentagem dos monócitos, monócitos intermediários e monócitos clássicos entre os grupos controle, sepse e choque séptico. (H à J) comparação da porcentagem dos monócitos, monócitos intermediários e monócitos clássicos entre os grupos controle e pacientes com quadro séptico (sepse + choque séptico). * $p < 0,05$.

Figura 14. Análise da porcentagem de monócitos nos diferentes grupos experimentais no dia 0

3.6 Quantificação das citocinas no D0 dos pacientes

Para determinação do perfil de citocinas e quimiocinas produzidas por cada um dos grupos, resolvemos quantificar um painel extenso destas moléculas (20 no total), através da técnica de Luminex. O painel adquirido congrega citocinas e quimiocinas sabidamente envolvidas durante a resposta inflamatória. Inicialmente, foram comparados os perfis das amostras no primeiro dia de coleta, ou seja, no Dia 0.

A concentração plasmática de IL-4, IP-10 (CXCL 10), IL-8, MIP-1 beta, IL-1 alfa e E-selectina estavam significativamente aumentadas nos grupos sepse e choque séptico se comparada aos controles saudáveis e aos controles internos da UTI (Figura 15). As demais citocinas não apresentaram diferenças claras entre os grupos e seus gráficos encontram-se compilados nas figuras suplementares 2 a 4.

Amostras de plasma foram obtidas de coletas de sangue periférico dos grupos: controle saudável, controle UTI, sepse e choque séptico e analisadas as citocinas usando um kit de Ensaio de Luminex. Cada ponto demonstrado no gráfico representa um indivíduo e os dados foram representados em mediana e intervalo interquartil, aplicado o teste de Kruskal-Wallis e encontramos alterações significativas em 6 citocinas: IL-4 (A), IP-10 (CXCL 10) (B), IL-8 (C), MIP-1 beta (D), IL-1 alfa (E) e E-selectina (F). Valores-p entre controles, pacientes com sepse e choque séptico no dia 0 são mostrados: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Figura 15. Análise das citocinas por Luminex das amostras dos pacientes no dia 0

Além disso, como não houve diferenças entre os grupos controles e também entre o grupo sepse e choque séptico, fizemos uma segunda análise agrupando os controles em um mesmo grupo e as amostras de sepse e choque séptico em um segundo grupo. Nesta análise, a diferença entre as concentrações plasmáticas das mesmas citocinas apresentou um p ainda maior, sendo $< 0,0001$ (****) (Figura 16).

Amostras de plasma foram obtidas de coletas de sangue periférico, quantificadas com o kit Ensaio de Luminex e plotados em dois grupos: controle saudável e controle UTI *versus* sepse e choque séptico. Cada ponto demonstrado no gráfico representa um indivíduo e os dados foram representados em mediana e intervalo interquartil, foi aplicado o teste de Mann-Whitney e encontramos alterações significativas em 6 citocinas: IL-4 (A), IP-10 (CXCL 10) (B), IL-8 (C), MIP-1 beta (D), IL-1 alfa (E) e E-selectina (F) com valores- $p < 0,0001$ (****) quando comparado entre os dois grupos com amostras obtidas no D0.

Figura 16. Análise das citocinas por Luminex das amostras dos pacientes com sepse e controle no dia 0

3.7 Quantificação das citocinas do D3 dos pacientes

Na análise do Dia 3, os pacientes diagnosticados com sepse e choque séptico e os pacientes controles internos da UTI que não haviam recebido alta foram submetidos a uma nova coleta de sangue periférico, tiveram uma nova quantificação de citocinas e quimiocinas realizadas pelo ensaio de Luminex. Como resultado, somente detectamos diferença significativa em duas moléculas, sendo elas IL-8 e a E-selectina. Enquanto a expressão da E-selectina seguiu o padrão encontrado no dia 0, ou seja, pacientes com qualquer quadro séptico possuem expressão aumentada em relação ao controle, a IL-8 no dia 3 foi a única molécula a ser diferencialmente expressa em choque séptico se comparada a sepse, sendo que não foi encontrada diferença entre os grupos sepse e controle (Figura 17).

Amostras de plasma foram obtidas de coletas de sangue periférico no dia 3 de internação dos grupos: controle UTI, sepsis e choque séptico e analisadas as citocinas usando um kit de Ensaio de Luminex. Cada ponto demonstrado no gráfico representa um indivíduo e os dados foram representados em mediana e intervalo interquartil, aplicado o teste de Kruskal-Wallis encontramos alterações significativas em 2 citocinas: IL-8 (A) e E-selectina (B). Valores-p entre controles, pacientes com sepsis e choque séptico no dia 3 são mostrados: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Figura 17. Análise das citocinas por Luminex das amostras dos pacientes no dia 3

Da mesma forma que foi feito na análise do D0, os pacientes foram agrupados em controles *versus* “com quadro séptico” e comparados entre si. As citocinas que apresentaram diferença estatisticamente significativa foram: IL-4, IP-10 (CXCL 10), IL-8 e IL-1 alfa com valor- $p < 0,05$ (*) e E-selectina com valor- $p < 0,0001$ (****) (Figura 18). Para as outras citocinas analisadas sem/baixo valor estatístico, todos os gráficos se encontram compilados nas figuras suplementares 5 a 7.

Amostras de plasma foram obtidas de coletas de sangue periférico, quantificadas com o kit Ensaio de Luminex e plotados em dois grupos: controle UTI *versus* sepse (sepse e choque séptico). Cada ponto demonstrado no gráfico representa um indivíduo e os dados foram representados em mediana e intervalo interquartil, foi aplicado o teste de Mann-Whitney e encontramos alterações significativas em 5 citocinas: IL-4 (A), IP-10 (CXCL 10) (B), IL-8 (C) e, IL-1 alfa (D) com valores- $p < 0,05$ (*) e E-selectina (E) com valor- $p < 0,0001$ (****) quando comparado entre os dois grupos com amostras obtidas no D3.

Figura 18. Análise das citocinas por Luminex das amostras dos pacientes com sepse e controle no dia 3

Como a única citocina a apresentar diferenças entre os grupos sepse e choque séptico no dia 3 foi a IL-8, investigamos se a mesma também estaria alterada no dia 7. Como pode ser visto no gráfico (Figura 19), apesar de uma tendência de aumento na expressão desta citocina no grupo choque séptico em comparação com o grupo sepse, não foi detectada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,17$, Mann-Whitney).

Amostras de plasma do dia 7 foram obtidas de aplicado o teste de Mann-Whitney, com $p < 0,17$.

Figura 19. Análise das citocinas por Luminex das amostras dos pacientes com sepse e choque séptico no dia 7

Na sequência, fizemos uma análise de agrupamento não enviesado, utilizando os valores das citocinas e quimiocinas medidos por Luminex nas amostras dos grupos controle UTI, sepse e choque séptico do dia 0. Esta análise tinha como objetivo saber se era possível obter um perfil de citocinas que diferenciasses os pacientes controles dos pacientes com quadro séptico e, mais importante, diferenciasses os pacientes com choque séptico dos pacientes com sepse.

Com base nos níveis das citocinas, dois grandes subgrupos foram formados (Figura 20). O subgrupo do “cluster” azul, com 18 pacientes no total, apresentou um perfil de expressão com menor nível geral de citocinas e é enriquecido de indivíduos controle: são 14 controles, dois pacientes com sepse e dois com choque séptico. Já o outro subgrupo, representado pela cor vermelha, apresentou um perfil com maior nível geral de citocinas e com 40 amostras no total. Destas amostras, somente cinco são de indivíduos controles e o restante é de pacientes com sepse (18) ou com choque séptico (17). Embora visualmente e numericamente fica a impressão de que os indivíduos controles e os com sepse podem ser agrupados pelo perfil de citocinas plasmáticas, não foi encontrado uma diferença estatisticamente significativa, com valor-p igual a 0,678001. Além disso, infelizmente não foi possível observar separação óbvia de pacientes com choque séptico dos com sepse pelo perfil de expressão de citocinas.

Amostras de plasma do dia 0 foram obtidas de coletas de sangue periférico, quantificadas com o kit Ensaio de Luminex e analisadas. No *heatmap* foram encontrados 2 subgrupos demonstrados no gráfico pela cor azul e vermelha. Foi aplicado o teste exato de Fisher, com $p < 0,678001$.

Figura 20. Heatmap da expressão das citocinas obtidas das amostras dos grupos experimentais do dia 0

3.8 Análise da expressão gênica por qPCR

Para investigar o papel da necroptose em pacientes com sepse e choque séptico, foi extraído o RNA das amostras de sangue periférico de todos os grupos experimentais, posteriormente realizado a conversão de RNA em cDNA e feito

o qPCR com os genes de interesse RIPK3 e MLKL. Para a normalização da expressão destes genes, utilizamos a média geométrica de GAPDH e β -actina.

Como pode ser observado na figura 21A, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão gênica de RIPK3 das amostras do dia 0 quando comparamos o grupo com todos os pacientes com quadro séptico e o grupo controle. O mesmo pode ser observado quando os pacientes foram separados nos grupos sepse e choque séptico e comparados com o controle (Figura 21B). Em relação à expressão de MLKL, também não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (Figuras 21C e 21D). O mesmo acontece quando realizada a análise do dia de coleta 3, em ambos os casos RIPK3 e MLKL não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (Figura Suplementar 8).

Análise do dia 0 da expressão gênica de RIPK3 (A) e expressão gênica de MLKL (C) agrupando os pacientes com sepse e choque séptico em um único grupo e comparando-os com os controles UTI. Análise do dia 0 da expressão gênica de RIPK3 (B) e expressão gênica de MLKL (D) comparando os grupos controle UTI, sepse e choque séptico. A expressão dos genes de interesse foi normalizada pela média geométrica da expressão dos genes de referência GAPDH e β -actina, também quantificados por qPCR. Não encontramos alterações significativas quando os grupos foram comparados.

Figura 21. Análise da expressão gênica por qPCR de RIPK3 e MLKL dos grupos experimentais no dia 0

3.9 Western blot para RIPK3 e MLKL

Além da quantificação dos transcritos de RIPK3 e MLKL, também realizamos a expressão proteica destas moléculas, a fim de entender se há variação das mesmas entre os grupos experimentais. Para tanto, foi feita a extração proteica de lisados de PBMC e foram utilizados os anticorpos anti-RIPK3, anti-MLKL e, para normalização, anti-GAPDH, como exemplificado na figura 22A.

A análise da expressão proteica de RIPK3 das amostras do dia 0 não mostrou diferenças estatísticas quando comparamos o grupo controle *versus* os pacientes com sepse e choque séptico agrupados (Figura 22B). Da mesma forma, não foi vista diferença de expressão quando os pacientes foram separados em grupos controle, sepse e choque séptico (Figura 22D).

Quando analisamos MLKL, foi observada uma diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo controle *versus* os pacientes com choque séptico e também quando agrupados em quadro séptico (Figura 22C). Esta diferença existe principalmente pela diminuição de expressão de MLKL no grupo choque séptico quando comparado com o grupo controle (Figura 22E). Em ambas as situações é possível observar que pacientes com quadro séptico e pacientes com sepse apresentam menor expressão de MLKL comparados com o grupo controle.

Western blot para as proteínas de PBMC dos grupos controle, sepse e choque séptico (A). Análise da expressão proteica de RIPK3 (B) e MLKL (C) agrupando os pacientes com sepse e choque séptico em um único grupo e comparando-os com os controles UTI. Análise da expressão proteica de RIPK3 (D) e MLKL (E) comparando os grupos controle UTI, sepse e choque séptico. A expressão dos genes de interesse foi normalizada pela razão da expressão do gene de referência GAPDH, também quantificados por *western blot*. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

Figura 22. Western blot de RIPK3 e MLKL dos grupos experimentais no dia 0

3.10 ELISA de RIPK3

A partir das amostras de plasma obtidas das coletas, decidimos utiliza-las para analisar a concentração de RIPK3 plasmático dos grupos experimentais no dia 0. Quando agrupados em controle (controle saudável e controle UTI) e sepse (sepse e choque séptico), foi encontrada diferenças estatisticamente significativas (Figura 23A). Também quando os grupos são separados, é possível observar diferenças entre os grupos de pacientes doentes dos grupos controles no dia 0 (Figura 23B).

Amostras de plasma foram obtidas de coletas de sangue periférico dos grupos: controle saudável, controle UTI, sepse e choque séptico e analisadas o RIPK3 circulante através dos dados obtidos pelo ensaio de ELISA. Cada ponto demonstrado no gráfico representa um indivíduo e os dados foram representados em mediana e intervalo interquartil e média e desvio padrão, aplicado o teste de ANOVA e Mann-Whitney e encontramos alterações significativas e valores-p correspondentes à *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Figura 23. Análise de RIPK3 circulante no plasma dos grupos experimentais no dia 0

4 DISCUSSÃO

O estudo incluiu coletas de sangue periférico dos indivíduos que se deram início em fevereiro de 2018 a outubro de 2018, o N amostral inicialmente proposto foi de 80 pacientes, o que corresponde a 20 pacientes de cada grupo: controle saudável, controle interno UTI (sem infecção), sepse e choque séptico. Dado ao rigoroso controle e a excelente abordagem terapêutica para os pacientes internados na UTI do Hospital Israelita Albert Einstein, o recrutamento dos pacientes foi bastante cuidadoso e meticuloso para que se respeitasse os critérios estabelecidos na categorização dos grupos experimentais. Ao final deste período, foi possível recrutar 100% do total de indivíduos previstos inicialmente, número que foi estabelecido por conveniência, como já abordado anteriormente. Os números totais dos seguimentos não foram atingidos por situações que já haviam sido previstas no desenvolvimento do projeto, e foi decorrente da alta hospitalar, dificuldade e restrição de acesso venoso, desistência de permanência no projeto e óbito. Curiosamente, nenhum dos pacientes evoluiu de quadro entre controle UTI, sepse e choque séptico. Sendo assim, não foi preciso fazer a alocação dos mesmos para um grupo diferente do original.

As características clínicas e demográficas dos pacientes apresentaram algumas diferenças importantes. Por exemplo, existe uma diferença marcante de idade entre os indivíduos saudáveis e os grupos de sepse, choque séptico e controle UTI. Isto ocorreu devido à uma dificuldade inicial de recrutamento dos pacientes. Sendo assim, decidimos antecipar a inclusão dos indivíduos saudáveis, o que impediu um melhor pareamento (Tabela 4). Em retrospectiva, deveríamos ter antecipado que nossos grupos experimentais iriam ser compostos de pessoas com mais idade, pelo perfil da população que utiliza os serviços da UTI da Instituição e fazer uma busca por esta população mais idosa para formação do grupo de controles saudáveis. De qualquer forma, o grupo saudável foi utilizado somente como validação do grupo interno da UTI, que serviu como grupo controle primário.

Outro ponto importante é a diferença dos sítios primários de infecção. Enquanto que nos pacientes com sepse a infecção é mais frequente no pulmão, nos casos de choque séptico há uma maior prevalência das infecções abdominais. Esta heterogeneidade pode ser um fator importante, pois diferentes microrganismos podem induzir mecanismos de resposta diversos, aumentando risco de viés de análise. Ainda sobre os patógenos, é interessante notar que mesmo nesta

coorte reduzida, houve uma maior frequência de infecção pela *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, o que está em acordo com o que é reportado na literatura.⁽¹⁷¹⁾ Como era de se esperar, dado que os sítios de infecção (bem como o agente infeccioso) eram diferentes entre os grupos experimentais (Tabela 5), também foi encontrada discrepância na antibioticoterapia utilizada ($p < 0,009$).

Em conjunto com a ressuscitação fluídica adequada, a utilização da antibioticoterapia é determinante para uma melhor taxa de sobrevivência dos pacientes com sepse e choque séptico, e isso é definido perante os tipos de microrganismos infecciosos identificados nos exames laboratoriais de amostras advindas dos pacientes e o perfil de sensibilidade à terapia antimicrobiana. Estes fatores são dependentes do diagnóstico rápido de qual microrganismo é o efector da infecção, e além disso um dos fatores que contribui para a escolha e a dosagem do antibiótico é a presença da disfunção orgânica.^(68,69) Especialmente em pacientes gravemente doentes o uso simultâneo de muitos agentes farmacológicos pode afetar significativamente a farmacocinética e farmacodinâmica da terapia antimicrobiana, o que pode ser catastrófico para pacientes sépticos em estado crítico, pois pode aumentar de forma considerável a mortalidade e a morbidade dos mesmos. É, portanto, importante salientar a baixíssima incidência de óbito (Tabela 6), mesmo no grupo choque séptico, o que indica bom uso da antibioticoterapia e um excelente manejo destes pacientes na Instituição. Estes resultados, comparados com os índices médios encontrados no Brasil (37,5% em instituições privadas e 55% em instituições públicas) são fortes indicativos de que há uma oportunidade enorme para uma redução acentuada de óbitos decorrentes da sepse utilizando-se somente tratamentos já existentes. Por outro lado, por não existir uma quantidade maior de óbitos, não foi possível utilizar este parâmetro como variável de desfecho, o que prejudicou algumas de nossas análises que visavam comparar os níveis de citocinas e de expressão de RIPK3 e MLKL entre os pacientes sobreviventes e os que vieram a óbito.

Diversos parâmetros importantes estão bastante equilibrados entre os grupos experimentais (sepse e choque séptico), tais como a idade, gênero, índice de massa corporal, tipo de admissão e comorbidades, além de quantidade de cristaloides e fluidos infundidos, o que facilita a análise das variáveis explicativas. Além disso, é importante ressaltar que este estudo tem como características principais ser prospectivo, piloto e um gerador de hipóteses. Estudos futuros para validação dos

achados deste projeto deverão obrigatoriamente ser realizados com grupos bem maiores e mais pareados.

A partir dos hemogramas, pudemos fazer diversas análises sobre a composição da série branca nos diferentes grupos analisados. Um dos parâmetros do diagnóstico clínico para um paciente com algum tipo de inflamação e/ou infecção é a realizado pela contagem dos leucócitos que apresentam alterações, exibindo resultados com números dos leucócitos totais maior que $12.000/\text{mm}^3$ ou menor que $4.000/\text{mm}^3$.⁽¹⁷²⁾ Apesar de encontrarmos pacientes com sepse que apresentam estas alterações, também foram encontrados pacientes no grupo controle com as mesmas características. E quando analisamos o número dos leucócitos totais entre os grupos controle, sepse e choque séptico, seja no dia 0, 3 ou 7 não foi encontrada diferença estatística (Figura 7). É possível perceber visualmente uma tendência de diminuição dos leucócitos totais nos pacientes com quadro séptico no dia 0, mas que, talvez pelo baixo n ou pelas condições específicas do grupo de pacientes estudados, não nos permite ter confiança estatística para afirmar que existe diferença entre os grupos.

Por outro lado, a redução da porcentagem e concentração dos linfócitos observada nos grupos experimentais (Figura 8), são concordantes com artigos já publicados, que relatam uma diminuição desta população em pacientes com quadro séptico utilizando parâmetros de diagnóstico de sepsis-1.⁽¹⁵²⁾ Da mesma forma, foi possível observar um aumento da porcentagem de neutrófilos em pacientes com quadro séptico. Este desbalanço de neutrófilos em pacientes sépticos podem estar associados a mecanismos de maior resistência a morte celular desta população,⁽¹⁷³⁾ o que pode contribuir para a alteração do perfil de liberação de citocinas, trazendo como consequência um quadro mais inflamatório ao paciente.

Para avaliar a gravidade da enfermidade causada pela sepse, inicialmente tentamos avaliar as concentrações de PCR e procalcitonina, mas não conseguimos coletar dados suficientes de procalcitonina, por motivo de opções de conduta médica durante o pedido e solicitação dos exames laboratoriais. Seguimos a análise com os dados de PCR, e observamos na figura 6 a relação positiva dos pacientes com quadro séptico quando comparados com o grupo controle. Apesar do número reduzido de coletas da PCR, nosso resultado confirma o que já foi mostrado anteriormente.⁽¹⁷⁴⁾ Outro fato importante é que, mesmo com a diferença na gravidade da doença, não encontramos alterações significativas no PCR quando comparado os grupos de sepse *versus* choque séptico.

Os resultados obtidos por citometria trouxeram dados novos e importantes, que podem auxiliar no diagnóstico dos pacientes sépticos, caso estes achados sejam validados em estudos com coortes maiores.

Os linfócitos B desempenham papéis imunorreguladores importantes durante a fase inicial da doença tais como células apresentadoras de antígenos e também como células produtoras de citocinas.⁽¹⁷⁵⁾ Foi mostrado em um estudo que utilizou o critério de diagnóstico sepsis-1, que desde a admissão, dia 3, dia 7, dia 14 e dia 28 o número absoluto de células CD19+ no sangue periférico foi significativamente menor em pacientes com choque séptico quando comparados com doadores saudáveis.^(176,177) Além disso, foi demonstrado que os linfócitos B tem função importante na produção de IL-10, auxiliando na inibição das citocinas pró-inflamatórias e diminuindo as respostas inflamatórias que ocorre durante o processo séptico.⁽¹⁷⁸⁾ Em nosso estudo não observamos diferenças estatisticamente significativas nas populações de linfócitos B entre os grupos experimentais. Isso pode estar diretamente correlacionado com o fato da IL-10 não ter apresentado diferença estatística em nossos resultados, o que será discutido posteriormente. Outro fato importante, é que é possível ver alguns pacientes *outliers* com níveis elevados de CD19+ no gráfico 10-B. Curiosamente, todos são do sexo feminino, e no grupo do choque séptico, todos possuem infecção abdominal (dados não mostrados). Não é possível afirmar que há correlação de fato entre estas características e os números elevados de linfócitos B, mas talvez seja uma possibilidade a ser analisada em estudos com coortes maiores.

Os resultados apresentados na figura 11 mostram que os linfócitos CD3+, seja CD4+ ou CD8+, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, em termos de porcentagem. Este dado está conflitante com o que foi encontrado através do hemograma nos mesmos pacientes, que mostram uma queda no número de linfócitos em pacientes com sepse. Uma das possíveis explicações é que o hemograma não diferencia linfócitos T, B e células NKT, mas ainda temos dificuldade em conciliar estes dados. De qualquer forma, estudos prévios mostram uma menor quantidade de linfócitos CD3+ em pacientes sépticos quando comparados com o grupo controle,^(149,154,179) o que parece estar mais alinhado com os resultados encontrados neste projeto através do hemograma.

Células NKT são células que possuem características de células NK e linfócitos T,⁽¹⁸⁰⁾ apresentando marcadores presentes em ambas as populações. Sua principal subpopulação expressa um TCR V α 14i semi-invariante, que é responsável

pelo reconhecimento dos lipídios e glicolipídios apresentados por CD1d. Apesar de possuírem TCR, sua participação durante uma resposta imune se assemelha mais às células NK, já que respondem prontamente ao estímulo, liberando quantidades importantes de citocinas que são relevantes para a modulação e a polarização da resposta adaptativa posterior.⁽¹⁸¹⁾ Dependendo do contexto e do estímulo, as células NKT podem assumir perfis de liberação de citocinas bastante distintos, secretando tanto IFN-gama, TNF como IL-4.^(181,182) Pouco, ou nada, se sabe sobre o envolvimento das células NKT no estabelecimento, gravidade ou progressão do quadro séptico em humanos. Foram encontradas até o momento evidências que as NKTs possam estar envolvidas em processos semelhantes advém de um estudo que correlaciona o aumento da proporção das células NKT CD4+ em pacientes com trauma quando comparados com os indivíduos saudáveis⁽¹⁸³⁾ e que não há diferença estatística significativa entre as células NKTs circulantes no sangue periférico de pacientes com sepse grave comparados com o grupo controle nas primeiras 24 horas de internação.⁽¹⁸⁴⁾ Em nosso estudo, detectamos uma alteração na porcentagem de células NKT, principalmente NKT CD4+ em pacientes com sepse (Figuras 12F e 12I). O aumento da proporção destas células talvez possa ser utilizado não somente como um marcador celular de um quadro séptico, mas também como apontar para um possível mecanismo presente na fisiopatologia desta doença. Entendemos que uma análise mais aprofundada sobre esta população deva ser alvo de futuros estudos em sepse.

Outro possível relevante resultado em nosso estudo é em relação à células NK (Figura 13), que reforçam os estudos anteriores que mostram uma redução desta população^(185,186) e vai contra outros que mostram porcentagens aumentadas de células NK em pacientes sépticos, relacionando este aumento com a mortalidade dos pacientes.^(187,188) Por outro lado, em pacientes com sepse grave, de acordo com o critério de *sepsis-1*, infectados por bactérias Gram-negativas, foi relatado um aumento de NK em porcentagem das células sanguíneas assim como uma melhora na sobrevida dos pacientes.⁽¹⁸⁹⁾ Além disso, foi mostrado que as células NK eram maiores em pacientes com sepse de origem infecciosa por bactérias Gram positivas do que entre pacientes com sepse por infecção de bactérias Gram-negativas, o que poderia explicar esta discrepância entre os estudos.⁽¹⁸⁶⁾ Em geral, no nosso estudo, as células NK foram importantes diferenciadores do perfil séptico, em específico as NK

CD56+^{DIM}CD16+^{bright} que apresentou $p < 0,001$ entre controle *versus* choque séptico e $p < 0,05$ entre sepse *versus* choque séptico.

Em relação à população de monócitos (Figura 14), foram detectadas diferenças entre os grupos controle *versus* choque séptico, sendo que esta diferença é explicada principalmente pela subpopulação de monócitos clássicos, já que não houve valor estatístico significativo com os monócitos intermediários. Não foi encontrada diferença entre os grupos choque séptico e sepse, nem entre sepse e controle, apesar de visualmente notarmos uma tendência, talvez pelo baixo número amostral. Interessantemente, estes resultados estão em parcial concordância com um estudo anterior, que mostrou que em quadro de sepse com inflamação aguda, os monócitos não clássicos e intermediários aumentam em porcentagem e há uma menor porcentagem dos monócitos clássicos.⁽¹⁹⁰⁾

As citocinas são caracterizadas por uma classe funcional de pequenos mediadores proteicos com baixo peso molecular (aproximadamente <40 kDa), que são liberados para promover a ativação e diferenciação da resposta imune.⁽¹⁹¹⁾ A interação de antígenos bacterianos e a ativação da resposta imune desencadeiam uma liberação inicial de citocinas e quimiocinas durante a infecção, auxiliando a depuração de patógenos invasores através de uma ativação subsequente da resposta imune inata e/ou adaptativa.^(43,192) Normalmente, no início da infecção há uma produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), IL-1, IL-2, IL-8 e IFN- γ .⁽¹⁹³⁾ Curiosamente, a única citocina que nossos pacientes com sepse e choque séptico apresentaram no dia 0 (primeiras 24 horas), de forma coincidente às citocinas acima citadas foi a IL-1 α .^(194,195)

A IL-1 tem duas formas pró-inflamatórias principais, IL-1 α e IL-1 β , que são centrais para as respostas do hospedeiro frente à infecção.⁽¹⁹⁶⁻¹⁹⁸⁾ A pro-IL-1 β é uma citocina inflamatória que é canonicamente clivada e, portanto, ativada pela caspase-1, sendo assim relacionada à presença de caspases ativas, formação de inflamassoma (canônico ou não-canônico) e frequentemente morte celular por piroptose.^(109,157,198) Como já mencionado anteriormente, IL-1 β não apresentou diferença significativa entre os grupos do nosso estudo, embora já tenha sido associada a uma resposta pró-inflamatória exacerbada e sepse em outros trabalhos.^(196,199) Por outro lado, a IL-1 α não requer clivagem por caspases para ser ativada, pois já é produzida em sua forma ativa, sendo sua regulação a nível

transcricional e/ou traducional⁽²⁰⁰⁾ Curiosamente, a necroptose, em modelos experimentais, mostrou ser um tipo de morte capaz de liberar IL-1 α sem a liberação de IL-1 β ,⁽²⁰¹⁾ diferentemente da piroptose, onde há uma produção de ambas citocinas.⁽²⁰²⁾ Em nosso estudo, a IL-1 α está aumentada nos grupos de pacientes com sepse e choque séptico, seja no dia 0 ou no dia 3, o que poderia indicar que este tipo de morte celular pode estar acontecendo em nossos pacientes durante estes dias.

Como mostrado na quantificação das citocinas por Luminex, nas figuras 15 e 16, IL-4 foi uma das citocinas que se mostraram aumentadas de forma significativa nos pacientes com sepse e choque séptico no dia 0 quando comparados aos indivíduos controle. A IL-4 é uma citocina anti-inflamatória conhecida por ter funções imunorreguladoras, participando na regulação da proliferação e diferenciação de diversos tipos de celulares: células T ativadas, mastócitos, eosinófilos e basófilos.⁽²⁰³⁾ Para ilustrar a sua participação na resposta imune, ela é importante para maturação e aumento da imunogenicidade das células T CD4⁺,⁽²⁰⁴⁻²⁰⁶⁾ promovendo sua diferenciação para um perfil Th2.⁽²⁰⁷⁾ Além disso, a IL-4 influi na secreção de citocinas anti-inflamatórias causando a diminuição de citocinas pró-inflamatórias derivadas de mastócitos.⁽²⁰⁸⁾ Em sepse, um estudo relatou que os níveis plasmáticos de IL-4 em pacientes sépticos no dia da admissão quando quantificados não diferiram entre sobreviventes e não sobreviventes.⁽²⁰⁹⁾ Como houve um único paciente que foi a óbito em nosso estudo, não foi possível fazer este mesmo tipo de análise. Porém, sabendo-se que o quadro de sepse também pode induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias (que podem inclusive levar a um quadro de imunossupressão expressivo nestes pacientes) não é totalmente inesperado que tal citocina esteja aumentada nestes pacientes em comparação com os controles. O aumento de IL-4 pode, portanto, estar contribuindo para uma resposta de homeostase do organismo, que se encontra extremamente inflamado. Diversos estudos mostram a relação positiva de IL-4 e a imunossupressão em pacientes com choque séptico.^(210,211) Interessante, porém, é o fato que esta citocina em nossa coorte já está elevada desde o início do diagnóstico, mesmo em pacientes menos graves (sem choque), o que sugere que os mecanismos de contrabalanceamento entram em ação em um momento mais precoce do que se pensava. Em relação à necroptose, há relatos que a infecção hepática induz necroptose de células de Kupffer, que estimulam os hepatócitos a liberarem IL-33 e, assim, aumentarem a produção de IL-4 em basófilos.⁽²¹²⁾

A lesão tecidual associada a infecções bacterianas é resultante, em parte, da infiltração de leucócitos recrutados por mediadores locais para o local da infecção, sendo que um grupo de mediadores importantes neste recrutamento são as quimiocinas. São caracterizadas por pequenas moléculas quimiotáticas, que são capazes de atrair e ativar os leucócitos nos tecidos durante a resposta inflamatória⁽²¹³⁾ A quimiocina chamada de proteína inflamatória de macrófagos-1 β (MIP-1 β) têm papel potencialmente importante no desenvolvimento de respostas inflamatórias durante a infecção por meio do recrutamento de células mononucleares para locais de inflamação, modulando a produção de citocinas e mediando sinais encontrados na SIRS, como a febre.^(214,215) Sua expressão é advinda das células hematopoiéticas e fibroblastos, sendo induzida por endotoxina, IL-1 e TNF- α . As respostas inflamatórias desencadeadas pela MIP-1 β atraem células T auxiliares do fenótipo naïve (CD45RA).⁽²¹⁶⁾ Além de modular as respostas inflamatórias das citocinas e o tráfego celular, as moléculas de MIP-1 β têm papel importante nas doenças infecciosas. O receptor celular para MIP-1 β , CCR5, demonstrou ser um co-receptor obrigatório para a entrada do vírus da imunodeficiência humana (HIV) em macrófagos.^(217,218) Em um estudo que foram analisadas 17 citocinas em 30 pacientes com sepse, foi observada uma associação positiva entre SOFA e MIP-1 β no dia 1 de diagnóstico e, nos primeiros três dias, os níveis de MIP-1 β estavam elevados.⁽²¹⁴⁾ Fato importante é que essa quimiocina se mostrou relevante durante a avaliação em nossos pacientes no dia 0 (Figura 15), o que parece corroborar os dados já publicados, reforçando a possibilidade de que MIP-1 β possa ser utilizada como um biomarcador durante a fisiopatologia da sepse.

Como abordado anteriormente, a fisiopatologia da sepse está associada ao recrutamento de leucócitos da corrente sanguínea para o espaço extra vascular, sendo necessário para um melhor manejo de uma resposta inflamatória à lesão ou infecção.^(26,219) Estudos mostraram que várias citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão são essenciais para esse processo.⁽²²⁰⁾ Uma das fases iniciais da cascata de adesão, chamada de rolamento leucocitário, é mediada por membros da família da selectina: L-selectina, P-selectina, E-selectina e adesão pela molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1).⁽²²¹⁾ A E-selectina tem sua expressão fortemente regulada positivamente pelas citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 β . A E-selectina é considerada a mais importante selectina para o tráfego celular em locais de inflamação em humanos, sua atividade retarda o rolamento de leucócitos para velocidades mais

baixas favorecendo a subsequente adesão de leucócitos, desempenhando um papel significativo na fisiopatologia do paciente séptico.⁽²²²⁾ Interessante enfatizar que a E-selectina pode ser encontrada em níveis baixos, de forma basal, mesmo na ausência de processos inflamatórios.⁽²²³⁾ Isto vai ao encontro de que nossos pacientes controles tanto internos da UTI quanto saudáveis mostrarem a expressão de tal molécula. Já os pacientes que apresentam bacteremia mostram valores elevados.⁽²²²⁾ assim como os indivíduos com quadro séptico em nosso estudo (Figura 15). Vale ressaltar que entre os principais membros da família da selectina somente E-selectina foi encontrada aumentada de forma estatisticamente significativa nas amostras dos pacientes com sepse e choque séptico nos diferentes dias de coleta (L-selectina não foi incluída em nossa análise).

Outro fato importante é que as quimiocinas podem ser subclassificadas em quatro grupos principais, através do número e espaçamento de cisteínas conservadas, sendo elas: CXC, CC, C e CX3C. A IL-8 pertence à família das quimiocinas Cisteína X Cisteína (CXC), que tem a sequência de ácidos Glutâmico-Leucina-Arginina (ELR), é um dos principais mediadores da resposta inflamatória tendo com sua principal função a indução de quimiotaxia em suas células-alvo, especialmente os neutrófilos.⁽²²⁴⁾ Portanto, esta citocina é descrita na literatura como fator quimiotático de neutrófilos. Sua relevância no quadro séptico vem sendo indicado como o fator mais preditivo para a morte desses pacientes. Em um destes estudos, além de altos níveis de IL-8, foi observada uma associação positiva significativa entre os níveis de MCP-1 e MIP-1 β nos primeiros três dias da sepse.⁽²¹⁴⁾ Vale, portanto, pontuar, que apesar de não termos condições de medir a associação da IL-8 com risco de óbito em nossa coorte, esta quimiocina foi a única molécula investigada que apresentou diferença de expressão entre os grupos sepse e choque séptico no dia 03, apontando para sua correlação com a gravidade da doença (Figura 17). Não foi observada diferença entre os pacientes nestes dois grupos no Dia 07, apesar de conseguirmos enxergar um discreto (e não estatisticamente significativo) aumento no grupo choque séptico. Esta falta de significância estatística pode ser resultado da inexistência de diferença entre os dois grupos ou um número amostral reduzido (somente 19 amostras, divididas entre os grupos).

A quimiocina CXCL-10, ou também conhecida como IP-10, é produzida durante períodos de infecção e inflamação em resposta a interferons tipo I e tipo II.^(225,226) O CXCL10 ativa o CXCR3, que é um receptor de quimiocinas acoplado a

proteína G, um relevante regulador do tráfico de linfócitos T *natural killer* (NKT) e T *helper* (Th1) que podem ser encontradas em PBMC.⁽²²⁷⁾ Recentemente, foi proposto um papel para a ativação do CXCR3 na patogênese da sepse grave.^(228,229) Em comparação com camundongos do tipo selvagem, camundongos deficientes em CXCR3 apresentam menor produção sistêmica de citocinas, atenuando a disfunção fisiológica e melhoram a sobrevivência durante a sepse grave causada por ligadura e punção do ceco (CLP).⁽²²⁸⁾ Em modelos murinos altas concentrações de CXCL10 estão presentes no líquido de lavagem peritoneal e plasma durante choque séptico induzido por CLP e se correlaciona com o desenvolvimento de disfunção fisiológica e mortalidade.⁽²²⁸⁾ O mesmo é encontrado em pacientes humanos, quando altos níveis de concentrações plasmáticas é correlacionada com a sepse e o choque séptico, tanto em adultos como em recém-nascidos.^(230,231) Os resultados CXCL10 e IL-8 de nossos pacientes reforçam a ideia existente que os mesmos podem ser biomarcadores úteis na fisiopatologia da sepse humana e, talvez, possíveis alvos de intervenção terapêutica.

Na tentativa de conseguir utilizar o perfil de secreção de citocinas de forma global, e não somente analisando-as individualmente, realizamos uma análise de agrupamento não enviesado utilizando a expressão de todas as citocinas. Como mostra a figura 20, o grupo de pacientes se separa do grupo de pacientes controle, mas as análises estatísticas não nos permitem afirmar com confiança que é possível usar esta análise para segregar os indivíduos nestes dois grupos. Acreditamos que com um maior número amostral seria possível encontrar diferença significativa entre os dois grupos, já que a segregação entre os mesmos é visualmente bastante clara. Por outro lado, não identificamos perfis diferenciais entre os pacientes com sepse e com choque séptico, o que é demonstrado pela falta de agrupamento em dois clusters distintos.

Em modelos murinos, a importância das moléculas de RIPK3 e MLKL (portanto, provavelmente a via de necroptose) na gravidade e letalidade do quadro séptico já foi fartamente documentada.^(159,160,163) Além disso, já foi demonstrado que a inflamação excessiva contribui para a depuração bacteriana de *S. aureus* defeituosa exibida por camundongos deficientes na expressão de MLKL (MLKL^{-/-}).⁽²²⁹⁾ Neste estudo, foi observado que depois do dia 5 de infecção, os camundongos MLKL^{-/-} tinham significativamente mais neutrófilos, macrófagos e células T $\gamma\delta$ recrutadas que camundongos selvagens no local da infecção. Além disso, no dia seguinte à infecção,

camundongos MLKL^{-/-} apresentaram significativa expressão da citocina IP-10 / CXCL10 derivadas de células T.

Baseado nestes resultados, tornou-se imperativo o estudo da relevância da via de necroptose na sepse e no choque séptico em humanos. Sendo assim, este trabalho teve como um dos seus focos principais a avaliação dos níveis de RIPK3 e MLKL nas células do sangue periférico de pacientes com esta enfermidade.

Os dados que avaliam a expressão de RIPK3 e MLKL, tanto por *western blot* (Figura 22) quanto por qPCR (Figura 21), nos mostraram resultados contra intuitivos se comparado com o que já foi publicado anteriormente. Como já abordado anteriormente na seção de introdução, existem poucas evidências que foram publicadas durante o período deste projeto, que avaliaram em pacientes sépticos a relação de RIPK3 e MLKL com sepse.⁽¹⁶⁴⁻¹⁶⁷⁾ Curiosamente todos eles utilizaram a técnica de ELISA para os estudos. Para o critério de diagnóstico somente um estudo utilizou o *sepsis-3*⁽¹⁶⁷⁾ mas, indiferentemente da forma escolhida para o critério de diagnóstico, o resultado encontrado foi o mesmo. Todos apresentaram uma relação positiva de níveis mais altos de RIPK3 ou MLKL em pacientes com o quadro séptico, sendo que estes níveis se correlacionam fortemente com prognóstico, gravidade e mortalidade dos pacientes.⁽¹⁶⁴⁻¹⁶⁷⁾

Também fizemos o mesmo experimento utilizando o kit de ELISA para detectar RIPK3 plasmático e, de fato, em pacientes sépticos há uma maior concentração de RIPK3 comparado aos grupos controles (Figura 23).

Apesar de muito interessante, a dosagem de RIPK3 e MLKL foi feita no plasma dos grupos experimentais e não diretamente nas células. Como a proteína RIPK3 e MLKL não são normalmente secretadas, colocamos a prova e com o intuito de validar estes achados, quantificando RIPK3 e MLKL diretamente na fração celular.

Quando analisamos os dados gerados por qPCR de RIPK3 nos surpreendeu o fato de que não havia associação significativa de maior expressão nos pacientes sépticos quando comparados com os pacientes controles (Figura 21B). Os mesmos resultados foram observados quando analisamos o qPCR de MLKL (Figura 21D). O que nos chamou a atenção foi observar que no gráfico podemos observar alguns *outliers* nos resultados de RIPK3 nos pacientes sépticos. Estes *outliers* que apresentaram maior expressão de RIPK3, quando foram identificados individualmente, todos tiveram o mesmo tipo de infecção, que foi a pneumonia. De forma semelhante, os *outliers* que podem ser visualizados nos pacientes sépticos no gráfico de expressão

proteica por *western blot* de MLKL (Figura 22E), também apresentaram pneumonia, o que sugere que possa ser um subgrupo interessante de avaliar em novos estudos. Exceto esta variável não foi possível rastrear outra característica em comum para estes *outliers*.

Para os dados do *western blot*, tivemos uma grande dificuldade de validar e padronizar um anticorpo anti-RIPK3 para usar em nossos experimentos, fato que pode ter interferido de forma considerável em nossos resultados. Não observamos diferença estatística significativa entre os grupos experimentais com o gene RIPK3, corroborando os dados encontrados por qPCR. Por outro lado, MLKL apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo controle *versus* os pacientes sépticos. Diferença esta que existe principalmente pela diminuição de expressão de MLKL. Esses dados sugerem que em nossa coorte, de alguma forma ainda não compreensível, a necroptose pode estar sendo modulada e até mesmo inibida nos pacientes sépticos quando comparado com os pacientes controles.

Uma das possibilidades aventadas seria que em pacientes com sepse ou choque séptico, as células mais sensíveis a este tipo de morte celular (com maior expressão destas moléculas) morrem. Neste caso, as células com baixa expressão seriam mais prevalentes nos pacientes com quadro séptico do que nos indivíduos controle. Isto também poderia explicar porque nos artigos já publicados seria possível ver um aumento de RIPK3 e MLKL plasmático.

Outra possibilidade é que a diferença estatística encontrada não se sustente em coortes maiores. Seria forçoso, portanto, concluir que, ao olhar para o conjunto total de células, o aumento ou diminuição de RIPK3 e MLKL seja experimentalmente imperceptível e que a averiguação dos níveis de ativação destas moléculas seja mais importante do que seus níveis de expressão. Infelizmente, ao testar os anticorpos contra as versões fosforiladas destas moléculas não obtivemos sucesso em sua visualização, talvez pelos níveis diminutos destas moléculas ativas seja pela baixa qualidade do anticorpo.

Por fim, vale a pena ressaltar que ainda resta provar que a via de necroptose realmente está ativa em pacientes com sepse ou choque séptico. Mesmo os artigos que mostram um aumento de RIPK3 e MLKL circulantes não respondem diretamente esta questão, já que a liberação destas moléculas pode ocorrer por diferentes tipos de morte celular necróticas.

Sendo assim, a relevância desta via para a progressão e gravidade de sepse ainda é incerta em seres humanos, apesar de evidências fortes em modelos animais sugerirem o mesmo. Há, portanto, ainda a necessidade de estudos mais aprofundados para entender a real relação da necroptose e a sepse em humanos.

5 CONCLUSÕES

1. Não foi possível identificar uma relação clara entre os níveis de MLKL e ou RIPK3 e a presença ou não de sepse, apesar de um indicativo que MLKL pode estar reduzido em pacientes com quadro séptico em relação ao grupo controle;
2. Em nossa coorte, os níveis de expressão de RIPK3 ou MLKL não são preditivos do grau de gravidade da doença (sepse *versus* choque séptico);
3. Como houve somente um óbito de paciente durante o tempo do projeto, não foi possível fazer as análises entre os níveis de RIPK3 e MLKL e este desfecho clínico;
3. Foram encontradas diferenças nas concentrações plasmáticas de IL-4, IP-10 (CXCL 10), IL-8, MIP-1 beta, IL-1 alfa e E-selectina entre os grupos sepse e choque séptico e os grupos controles saudáveis e controles internos da UTI;
4. A análise por imunofenotipagem indicou que as porcentagens de células NKT, células NK e monócitos tem o potencial de serem utilizados como biomarcadores de sepse e/ou choque séptico.

6 ANEXOS

Anexo 1. Formulários eletrônicos *Research Electronic Data Capture* (REDCap®)

Confidential

Avaliação da Via da Necroptose em Pacientes com Seps
Page 1 of 27**Dados Demograficos**

Record ID

INCLUSÃO

Data de Inclusão

Data de Admissão no Hospital

Local do Paciente

- ☐ Ala
☐ Semi-Intensiva
☐ UTI

Data de Admissão na Semi-Intensiva

Data de Admissão na UTI

Data de Início da Seps

Procedência

- ☐ Unidade de Pronto Atendimento
☐ Ala
☐ Semi-Intensiva
☐ Núcleo Assistencial / Consultório HIAE
☐ Consultório Externo
☐ Centro Cirúrgico
☐ Hemodinâmica / RAVA
☐ MDP
☐ Outros

Outra Procedência

Unidade de Pronto Atendimento

- ☐ Morumbi
☐ Alphaville
☐ Ibirapuera
☐ Perdizes
☐ Klabin
☐ Oncologia

Código Amarelo?

- ☐ Sim ☐ Não

Diagnóstico

- ☐ Seps
☐ Choque Séptico

DADOS DEMOGRÁFICOS

Prontuário

Passagem

Data de Nascimento

Idade

(Anos)

Sexo

- ☐ Masculino ☐ Feminino

Confidential

Page 2 of 27

Peso	<hr/>
	(Kilogramas)
Altura	<hr/>
	(Centímetros)
Raça	☐ Negra ☐ Branca ☐ Oriental ☐ Parda
Tipo de Admissão	☐ Cirúrgica ☐ Clínica
Tipo de Cirurgia	☐ Eletiva ☐ Urgência ☐ Emergência
Sítio da Cirurgia	☐ Cirurgia Abdominal ☐ Cirurgia Torácica ☐ Cirurgia Vascular ☐ Transplante ☐ Cirurgia Ortopédica ☐ Cirurgia Ginecológica ou Obstétrica ☐ Neurocirurgia ☐ Cirurgia Cardíaca ☐ Cirurgia do Trauma ☐ Cirurgia Urológica ☐ Cabeça e Pescoço ☐ Outros
Outra cirurgia	<hr/>

Confidential

Page 3 of 27

Motivo Clínico da Internação
(em caso de mais de um motivo, marque o mais relevante)

- ☐ Monitorização
- ☐ Choque Hipovolêmico Não-Hemorrágico
- ☐ Choque Hemorrágico
- ☐ Choque Cardiogênico
- ☐ Choque Séptico
- ☐ Choque Anafilático
- ☐ Choque Misto ou Indefinido
- ☐ Arritmia Cardíaca
- ☐ Síndrome Coronariana Aguda
- ☐ Crise Hipertensiva
- ☐ ICC Aguda sem Choque
- ☐ Rebaixamento do Nível de Consciência
- ☐ Convulsão
- ☐ Hipertensão Intra-Craniana
- ☐ AVC Isquêmico
- ☐ AVC Hemorrágico
- ☐ Hemorragia Subaracnoidea
- ☐ Insuficiência Renal Aguda Pré-Renal
- ☐ Insuficiência Renal Aguda Pós-Renal
- ☐ Insuficiência Renal Aguda Renal
- ☐ Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
- ☐ Exacerbação de Doença Pulmonar Crônica (qualquer)
- ☐ Insuficiência Hepática Aguda
- ☐ Abdome Agudo
- ☐ Pancreatite
- ☐ Síndrome Hemorrágica / CIVD
- ☐ Hemólise Grave
- ☐ Distúrbio Ácido-Base ou Hidroeletrolítico
- ☐ Hipotermia ou Hipertermia
- ☐ Hipoglicemia ou Hiperglicemia
- ☐ Seps
- ☐ Outros

Co-Morbididades

- ☐ Nenhuma
- ☐ Hipertensão Arterial
- ☐ Insuficiência Cardíaca
- ☐ Diabetes Mellitus
- ☐ Insuficiência Renal Crônica
- ☐ Cirrose Hepática
- ☐ DPOC
- ☐ Câncer
- ☐ Doença Neuromuscular
- ☐ AIDS
- ☐ Transplantado Prévio
- ☐ Imunossupressão
- ☐ Desnutrição Grave
- ☐ Etilismo
- ☐ Outra

Outra Co-Morbidade

Classe Funcional da ICC

- ☐ NYHA I
- ☐ NYHA II
- ☐ NYHA III
- ☐ NYHA IV

Tratamento Diabetes Mellitus

- ☐ Nenhum
- ☐ Hipoglicemiante Oral
- ☐ Insulina

Tratamento da Insuficiência Renal Crônica

- ☐ Conservador
- ☐ Hemodiálise

05-02-2018 16:44

www.projectredcap.org

Confidential

Page 4 of 27

Estágio do Câncer

- ☐ Atual Localizado
☐ Atual Metastático
☐ Prévio (tratado com sucesso)

Tipo de Câncer

- ☐ Sistema Nervoso Central
☐ Cabeça e Pescoço
☐ Pulmão
☐ Estômago
☐ Fígado
☐ Rím
☐ Mama
☐ Próstata
☐ Colón
☐ Pâncreas
☐ Bexiga
☐ Hematológico
☐ Músculo-esquelético
☐ Outro

Outro Tipo de Câncer

Tipo de Doença Neuromuscular

- ☐ Síndrome de Guillain-Barre
☐ Esclerose Múltipla
☐ Esclerose Lateral Amiotrófica
☐ Miastenia Gravis
☐ Outro

Tipo de Imunossupressão

- ☐ Corticóide
☐ Quimioterapia
☐ Outros

DADOS DA INFECÇÃO

Foco Infeccioso

- ☐ Pneumonia
☐ Infecção Urinária Baixa
☐ Pielonefrite
☐ Infecção Abdominal Aguda
☐ Meningite
☐ Peles / Partes Moles
☐ Infecção Óssea / Articular
☐ Infecção de Ferida Operatória
☐ Infecção de Corrente Sanguínea
☐ Endocardite
☐ Infecção de Prótese
☐ Outras

Infecção de Corrente Sanguínea

- ☐ Espontânea
☐ Relacionada a Cateter Central
☐ Associada a Cateter Central

Outro Foco Infeccioso

Tipo de Infecção

- ☐ Comunitária
☐ Nosocomial
☐ Relacionada a Assistência em Saúde

Infecção Comprovada Biologicamente por Cultura

- ☐ Sim ☐ Não

Data e Hora da Confirmação Microbiológica

ESCORES PROGNÓSTICOS

Valor do SAPS III

qSOFA Prévio ou no Dia do Diagnóstico

- ☐ Nenhum
☐ Pressão Arterial Sistólica $\leq$ 100 mmHg
☐ Frequência Respiratória $\geq$ 22 mpn
☐ Alteração do Nível de Consciência (Glasgow $<$ 15)

DISFUNÇÃO ORGÂNICA NA INCLUSÃO

Disfunção Orgânica Presente?

(considerar o momento do diagnóstico e que não esteja relacionado ao local da infecção e que não seja secundário a uma doença crônica)
 (ATENÇÃO: disfunção respiratória deve ser considerada mesmo em casos de infecção respiratória)

☐ Sim ☐ Não

Data e Hora da Primeira Disfunção Orgânica

	Sim	Não
Pressão Arterial Sistólica $<$ 90 mmHg	☐	☐
Pressão Arterial Média $<$ 65 mmHg	☐	☐
Queda da Pressão Arterial Sistólica $>$ 40 mmHg	☐	☐
Bilirrubina Total $>$ 2 mg/dL	☐	☐
Lactato $>$ 2 mmol/L (18 mg/dL)	☐	☐
Plaquetas $<$ 100.000	☐	☐
Creatinina $>$ 2 mg/dL	☐	☐
Diurese $<$ 0.5 ml/kg/h nas últimas 2 horas	☐	☐
INR $>$ 1.5	☐	☐
TTPa $>$ 60 segundos	☐	☐
Infiltrado Pulmonar Bilateral Recente e PaO ₂ / FiO ₂ $<$ 300	☐	☐
Infiltrado Pulmonar Bilateral Recente e Necessidade de Oxigênio para manter SpO ₂ $>$ 90%	☐	☐
Maior Necessidade de Oxigênio	☐	☐
Alteração do Nível de Consciência	☐	☐
Acidose	☐	☐

Confidential

Page 6 of 27

SOFA Respiratório	☐ PaO ₂ / FiO ₂ > 400 ☐ PaO ₂ / FiO ₂ < 400 ☐ PaO ₂ / FiO ₂ < 300 ☐ PaO ₂ / FiO ₂ < 200 e Ventilação Mecânica ☐ PaO ₂ / FiO ₂ < 100 e Ventilação Mecânica
SOFA Sistema Nervoso Central	☐ Glasgow 15 ☐ Glasgow 13 - 14 ☐ Glasgow 10 - 12 ☐ Glasgow 6 - 9 ☐ Glasgow < 6
SOFA Cardiovascular	☐ Sem Hipotensão ☐ Pressão Arterial Média < 70 mmHg ☐ Dopamina ≤ 5 ug/kg/min ou Dobutamina (qualquer dose) ☐ Dopamina > 5 ug/kg/min ou Noradrenalina ≤ 0.1 ug/kg/min ou Adrenalina ≤ 0.1 ug/kg/min ☐ Dopamina > 15 ug/kg/min ou Noradrenalina > 0.1 ug/kg/min ou Adrenalina > 0.1 ug/kg/min
SOFA Hepático	☐ Bilirrubina < 1.2 mg/dL ☐ Bilirrubina 1.2 - 1.9 mg/dL ☐ Bilirrubina 2.0 - 5.9 mg/dL ☐ Bilirrubina 6.0 - 11.9 mg/dL ☐ Bilirrubina > 12.0 mg/dL
SOFA Coagulação	☐ Plaqueta > 150.000 ☐ Plaqueta 100.000 - 149.000 ☐ Plaqueta 50.000 - 99.000 ☐ Plaqueta 20.000 - 49.000 ☐ Plaqueta < 20.000
SOFA Renal	☐ Creatinina < 1.2 mg/dL ☐ Creatinina 1.2 - 1.9 mg/dL ☐ Creatinina 2.0 - 3.4 mg/dL ☐ Creatinina 3.5 - 4.9 mg/dL ou Débito Urinário < 500 ml/dia ☐ Creatinina > 5.0 mg/dL ou Débito Urinário < 200 ml/dia
Evolução para Choque Séptico	☐ Sim ☐ Não
Suporte Necessário Antes da Admissão a UTI	☐ Reanimação Cardio-Pulmonar ☐ Droga Vasoativa ☐ Ventilação Invasiva ☐ Nenhum

EXAMES LABORATORIAIS

Lactato Coletado	☐ Sim ☐ Não
Data e Hora do Primeiro Lactato Coletado	_____
Valor do Primeiro Lactato	_____
	(mg/dL)
Data e Hora do Segundo Lactato Coletado	_____
Valor do Segundo Lactato	_____
	(mg/dL)

Confidential

Page 7 of 27

Clearance do Lactato	_____
Culturas Coletadas	☐ Sim ☐ Não
Momento de Coleta das Culturas	☐ Antes do Início do Antibiótico ☐ Após o Início do Antibiótico
Tipo de Cultura	☐ Hemocultura ☐ Secreção Traqueal ☐ Líquor ☐ Urina ☐ Outra
Data e Hora da Primeira Hemocultura	_____
Resultado da Primeira Hemocultura	_____ (Colocar "Negativa" se nenhum germe)
Data e Hora da Segunda Hemocultura	_____
Resultado da Segunda Hemocultura	_____ (Colocar "Negativa" se nenhum germe)
Data e Hora da Cultura de Secreção Traqueal	_____
Resultado da Cultura de Secreção Traqueal	_____ (Colocar "Negativa" se nenhum germe)
Data e Hora da Cultura de Líquor	_____
Resultado da Cultura de Líquor	_____ (Colocar "Negativa" se nenhum germe)
Data e Hora da Cultura de Urina	_____
Resultado da Cultura de Urina	_____ (Colocar "Negativa" se nenhum germe)
Outro Tipo de Cultura (Material)	_____
Data e Hora do Outro Tipo de Cultura	_____
Resultado do Outro Tipo de Cultura	_____ (Colocar "Negativa" se nenhum germe)

Tratamento Inicial**INÍCIO DO TRATAMENTO**

Coletado Pacote Sepsis

☐ Sim ☐ Não

Momento de Abertura do Protocolo

ANTIBIOTICOTERAPIA

Recebia Antibiótico Antes da Sepsis

☐ Sim ☐ Não

Número de Antibióticos Recebidos Antes do Diagnóstico

☐ 1
☐ 2
☐ 3
☐ 4

Antibiótico Recebido Antes da Sepsis (1)

Data e Hora de Início do Antibiótico 1

Antibiótico Recebido Antes da Sepsis (2)

Data e Hora de Início do Antibiótico 2

Antibiótico Recebido Antes da Sepsis (3)

Data e Hora de Início do Antibiótico 3

Antibiótico Recebido Antes da Sepsis (4)

Data e Hora de Início do Antibiótico 4

Recebeu Antibiótico no Momento do Diagnóstico de Sepsis

☐ Sim ☐ Não

Número de Antibióticos Recebidos no Momento do Diagnóstico de Sepsis

☐ 1
☐ 2
☐ 3
☐ 4

Antibiótico Recebido no Momento do Diagnóstico de Sepsis (1)

Data e Hora de Início do Antibiótico 1

Antibiótico Recebido no Momento do Diagnóstico de Sepsis (2)

Data e Hora de Início do Antibiótico 2

Antibiótico Recebido no Momento do Diagnóstico de Sepsis (3)

Data e Hora de Início do Antibiótico 3

Confidential

Page 9 of 27

Antibiótico Recebido no Momento do Diagnóstico de Seps (4)

Data e Hora de Início do Antibiótico 4

TRATAMENTO DA HIPOTENSÃO

O Paciente Apresentava Hipotensão

☐ Sim ☐ Não

Tipo de Hipotensão

- ☐ Pressão Arterial Sistólica < 90 mmHg
☐ Pressão Arterial Média < 65 mmHg
☐ Queda na Pressão Arterial Sistólica > 40 mmHg

O Paciente Apresentava Lactato Inicial ≥ 20 mg/dL☐ Sim ☐ Não

Recebeu > 30 ml/kg de Cristalóide ou Equivalente em Colóide

☐ Sim ☐ Não

Total de Fluido Recebido na Ressuscitação Inicial

(Mililitros)

Início da Primeira Infusão Volêmica

Manutenção da Pressão Arterial Média ≥ 65 mmHg Após Ressuscitação Inicial☐ Sim ☐ Não

Necessidade de Vasopressor

☐ Sim ☐ Não

Tipo de Vasopressor

- ☐ Dopamina
☐ Dobutamina
☐ Noradrenalina
☐ Vasopressina
☐ Adrenalina

Dose de Dopamina no Momento da Inclusão

(ug/kg/min)

Dose de Dobutamina no Momento da Inclusão

(ug/kg/min)

Dose de Noradrenalina no Momento da Inclusão

(ug/kg/min)

Dose de Vasopressina no Momento da Inclusão

(U/min)

Dose de Adrenalina no Momento da Inclusão

(ug/kg/min)

Manutenção da Pressão Arterial Média ≥ 65 mmHg Após 6 Horas☐ Sim ☐ Não

Confidential

Page 10 of 27

CORTICOTERAPIA

Indicação para Receber Corticóide

☐ Sim ☐ Não

Recebeu Dose Preconizada de Corticóide

☐ Não
☐ Sim, após 24 horas
☐ Sim, dentro das primeiras 24 horas

Data e Hora de Início do Corticóide

OUTROS SUPORTES DE VIDA

Outros Suportes

☐ Nenhum
☐ Ventilação Mecânica
☐ Ventilação Não-Invasiva
☐ Hemodiálise

Tipo de Hemodiálise

☐ CVVHDF ☐ Convencional

Confidential

Avaliação da Via da Necroptose em Pacientes com Sepsis
Page 11 of 27**Avaliação Diária**

Realizado Follow-Up

☐ Sim ☐ Não

Data da Avaliação

AMOSTRAS PARA O ESTUDO

Amostra Biológica Coletada

☐ Sim ☐ Não

Data e Hora da Coleta da Amostra

Sítio de Coleta

☐ Arterial
☐ Venosa Periférica
☐ Venosa Central**SINAIS VITAIS**

Escala de Coma de Glasgow

Maior Temperatura

(°C)

Maior Frequência Cardíaca

(bpm)

Menor Pressão Arterial Sistólica

(mmHg)

Menor Pressão Arterial Média

(mmHg)

Maior Frequência Respiratória

(mpm)

Total de Fluido Recebido em 24 Horas

(Mililitros)

Diurese em 24 Horas

(Mililitros)

Balanço Hídrico em 24 Horas

(Mililitros)**SUORTE DE VIDA**

Necessidade de Vasopressor em Algum Momento

☐ Sim ☐ Não

Vasopressor

☐ Dopamina
☐ Dobutamina
☐ Noradrenalina
☐ Vasopressina
☐ Adrenalina

Confidential

Page 12 of 27

Dose Acumulada Diária de Dopamina	<input type="text"/>
	(ug)
Dose Acumulada Diária de Dobutamina	<input type="text"/>
	(ug)
Dose Acumulada Diária de Noradrenalina	<input type="text"/>
	(ug)
Dose Acumulada Diária de Vasopressina	<input type="text"/>
	(U)
Dose Acumulada Diária de Adrenalina	<input type="text"/>
	(ug)
Necessidade de Ventilação Mecânica Invasiva em Algum Momento	☐ Sim ☐ Não
Maior FiO2	<input type="text"/>
	(%)
Necessidade de Hemodiálise em Algum Momento	☐ Sim ☐ Não
Tipo de Hemodiálise	☐ CVVHDF ☐ Convencional

EXAMES LABORATORIAIS

Menor pH	<input type="text"/>
Maior Lactato	<input type="text"/>
	(mg/dL)
Menor Base Excess	<input type="text"/>
	(mEq/L)
Menor Bicarbonato	<input type="text"/>
	(mEq/L)
Menor PaO2	<input type="text"/>
	(mmHg)
Maior PaCO2	<input type="text"/>
	(mmHg)
Creatinina	<input type="text"/>
	(mg/dL)
Uréia	<input type="text"/>
	(mg/dL)
Maior Sódio	<input type="text"/>
	(mEq/L)
Maior Potássio	<input type="text"/>
	(mEq/L)
Leucócitos	<input type="text"/>
	(cels/mm ³)
Plaquetas	<input type="text"/>
	(10 ³ /dL)

05-02-2018 16:44

www.projectredcap.org

Confidential

Page 13 of 27

Bilirrubina Total

(mg/dL)

Desfechos**SOFA NA ALTA DA UTI**

SOFA Respiratório	☐ PaO ₂ / FiO ₂ > 400
☐ PaO ₂ / FiO ₂ < 400
☐ PaO ₂ / FiO ₂ < 300
☐ PaO ₂ / FiO ₂ < 200 e Ventilação Mecânica
☐ PaO ₂ / FiO ₂ < 100 e Ventilação Mecânica
SOFA Sistema Nervoso Central	☐ Glasgow 15
☐ Glasgow 13 - 14
☐ Glasgow 10 - 12
☐ Glasgow 6 - 9
☐ Glasgow < 6
SOFA Cardiovascular	☐ Sem Hipotensão
☐ Pressão Arterial Média < 70 mmHg
☐ Dopamina ≤ 5 ug/kg/min ou Dobutamina (qualquer dose)
☐ Dopamina > 5 ug/kg/min ou Noradrenalina ≤ 0.1 ug/kg/min ou Adrenalina ≤ 0.1 ug/kg/min
☐ Dopamina > 15 ug/kg/min ou Noradrenalina > 0.1 ug/kg/min ou Adrenalina > 0.1 ug/kg/min
SOFA Hepático	☐ Bilirrubina < 1.2 mg/dL
☐ Bilirrubina 1.2 - 1.9 mg/dL
☐ Bilirrubina 2.0 - 5.9 mg/dL
☐ Bilirrubina 6.0 - 11.9 mg/dL
☐ Bilirrubina > 12.0 mg/dL
SOFA Coagulação	☐ Plaqueta > 150.000
☐ Plaqueta 100.000 - 149.000
☐ Plaqueta 50.000 - 99.000
☐ Plaqueta 20.000 - 49.000
☐ Plaqueta < 20.000
SOFA Renal	☐ Creatinina < 1.2 mg/dL
☐ Creatinina 1.2 - 1.9 mg/dL
☐ Creatinina 2.0 - 3.4 mg/dL
☐ Creatinina 3.5 - 4.9 mg/dL ou Débito Urinário < 500 ml/dia
☐ Creatinina > 5.0 mg/dL ou Débito Urinário < 200 ml/dia

CUIDADOS PALIATIVOS

Evolução Para Cuidados Paliativos em Algum Momento ☐ Sim ☐ Não

Data e Hora do Início do Paliativo _____

DESFECHO CLÍNICO

Data da Alta da UTI

Destino na Alta da UTI

- ☐ Semi-Intensiva
- ☐ Ala
- ☐ Casa
- ☐ Óbito

Data da Alta da Semi-Intensiva

Destino na Alta da Semi-Intensiva

- ☐ Ala
- ☐ Casa
- ☐ Óbito

Data da Alta do Hospital

Destino na Alta do Hospital

- ☐ Casa
- ☐ Instituição de Longa Permanência
- ☐ Óbito

Status no Dia 28

- ☐ Vivo em Casa
- ☐ Vivo na UTI
- ☐ Vivo no Hospital
- ☐ Vivo em Instituição de Longa Permanência
- ☐ Óbito

Causa da Óbito

Confidential

Avaliação da Via da Necroptose em Pacientes com Sepsis
Page 16 of 27**Avaliação Laboratorial**

E-Selectin	
GM-CSF	
ICAM-1 / CD54	
IFN-alfa	
IFN-gamma	
IL-1 alfa	
IL-1 beta	
IL-4	
IL-6	
IL-8	
IL-10	
IL-12p70	
IL-13	
IL-18	
IL-33	
IL-17A/CTLA-8	
IP-10/CXCL10	
MCP-1/CCL2	
MIP-1 alpha/CCL3	
MIP-1 beta/CCL4	
Sp-Selectin	
TNF-alfa	
RIPK-1	
RIPK-3	
pRIPK-3	
MLKL	
pMLKL	
Caspase 8 Clivada	
Caspase 3 Clivada	
Caspase 8	
Caspase 11	

05-02-2018 16:44

www.projectredcap.org

Confidential

Page 17 of 27

Caspase 1	
CYLD	
clAP1	
clAP2	
cFLIP	
FADD	
PARP	

Confidential

Avaliação da Via da Necroptose em Pacientes com Sepsis
Page 18 of 27**Dados Demograficos (Paciente UTI)****INCLUSÃO**

Data de Inclusão	_____
Data de Admissão no Hospital	_____
Data de Admissão na UTI	_____
Procedência	☐ Unidade de Pronto Atendimento ☐ Ala ☐ Semi-Intensiva ☐ Núcleo Assistencial / Consultório HIAE ☐ Consultório Externo ☐ Centro Cirúrgico ☐ Hemodinâmica / RAVA ☐ MDP ☐ Outros
Outra Procedência	_____
Unidade de Pronto Atendimento	☐ Morumbi ☐ Alphaville ☐ Ibirapuera ☐ Perdizes ☐ Klabin ☐ Oncologia

DADOS DEMOGRÁFICOS

Prontuário	_____
Passagem	_____
Data de Nascimento	_____
Idade	_____
	(Anos)
Sexo	☐ Masculino ☐ Feminino
Peso	_____
	(Kilogramas)
Altura	_____
	(Centímetros)
Raça	☐ Negra ☐ Branca ☐ Oriental ☐ Parda
Tipo de Admissão	☐ Cirúrgica ☐ Clínica

Confidential

Page 19 of 27

Tipo de Cirurgia

- ☐ Eletiva
☐ Urgência
☐ Emergência

Sítio da Cirurgia

- ☐ Cirurgia Abdominal
☐ Cirurgia Torácica
☐ Cirurgia Vascular
☐ Transplante
☐ Cirurgia Ortopédica
☐ Cirurgia Ginecológica ou Obstétrica
☐ Neurocirurgia
☐ Cirurgia Cardíaca
☐ Cirurgia do Trauma
☐ Cirurgia Urológica
☐ Cabeça e Pescoço
☐ Outros

Outra cirurgia

Motivo Clínico da Internação
(em caso de mais de um motivo, marque o mais relevante)

- ☐ Monitorização
☐ Choque Hipovolêmico Não-Hemorrágico
☐ Choque Hemorrágico
☐ Choque Cardiogênico
☐ Choque Anafilático
☐ Arritmia Cardíaca
☐ Síndrome Coronariana Aguda
☐ Crise Hipertensiva
☐ ICC Aguda sem Choque
☐ Rebaixamento do Nível de Consciência
☐ Convulsão
☐ Hipertensão Intra-Craniana
☐ AVC Isquêmico
☐ AVC Hemorrágico
☐ Hemorragia Subaracnoidea
☐ Insuficiência Renal Aguda Pré-Renal
☐ Insuficiência Renal Aguda Pós-Renal
☐ Insuficiência Renal Aguda Renal
☐ Síndrome Hemorrágica / CIVD
☐ Hemólise Grave
☐ Distúrbio Ácido-Base ou Hidroeletrolítico
☐ Hipotermia ou Hipertermia
☐ Hipoglicemia ou Hiperglicemia
☐ Outros

Outro Motivo de Internação

Co-Morbidades

- ☐ Nenhuma
☐ Hipertensão Arterial
☐ Insuficiência Cardíaca
☐ Diabetes Mellitus
☐ Insuficiência Renal Crônica
☐ Cirrose Hepática
☐ DPOC
☐ Câncer
☐ Doença Neuromuscular
☐ AIDS
☐ Transplantado Prévio
☐ Imunossupressão
☐ Desnutrição Grave
☐ Etilismo
☐ Outra

Outra Co-Morbidade

05-02-2018 16:44

www.projectredcap.org

Confidential

Page 20 of 27

Classe Funcional da ICC	☐ NYHA I ☐ NYHA II ☐ NYHA III ☐ NYHA IV
Tratamento Diabetes Mellitus	☐ Nenhum ☐ Hipoglicemiante Oral ☐ Insulina
Tratamento da Insuficiência Renal Crônica	☐ Conservador ☐ Hemodiálise
Estágio do Câncer	☐ Atual Localizado ☐ Atual Metastático ☐ Prévio (tratado com sucesso)
Tipo de Câncer	☐ Sistema Nervoso Central ☐ Cabeça e Pescoço ☐ Pulmão ☐ Estômago ☐ Fígado ☐ Rim ☐ Mama ☐ Próstata ☐ Colón ☐ Pâncreas ☐ Bexiga ☐ Hematológico ☐ Músculo-esquelético ☐ Outro
Outro Tipo de Câncer	_____
Tipo de Doença Neuromuscular	☐ Síndrome de Guillain-Barre ☐ Esclerose Múltipla ☐ Esclerose Lateral Amiotrófica ☐ Miastenia Gravis ☐ Outro
Outra Doença Neuromuscular	_____
Tipo de Imunossupressão	☐ Corticóide ☐ Quimioterapia ☐ Outros

ESCORES PROGNÓSTICOS

Valor do SAPS III	_____
SOFA Respiratório	☐ PaO ₂ / FiO ₂ > 400 ☐ PaO ₂ / FiO ₂ < 400 ☐ PaO ₂ / FiO ₂ < 300 ☐ PaO ₂ / FiO ₂ < 200 e Ventilação Mecânica ☐ PaO ₂ / FiO ₂ < 100 e Ventilação Mecânica
SOFA Sistema Nervoso Central	☐ Glasgow 15 ☐ Glasgow 13 - 14 ☐ Glasgow 10 - 12 ☐ Glasgow 6 - 9 ☐ Glasgow < 6

Confidential

Page 21 of 27

SOFA Cardiovascular

- ☐ Sem Hipotensão
☐ Pressão Arterial Média < 70 mmHg
☐ Dopamina ≤ 5 ug/kg/min ou Dobutamina (qualquer dose)
☐ Dopamina > 5 ug/kg/min ou Noradrenalina ≤ 0.1 ug/kg/min ou Adrenalina ≤ 0.1 ug/kg/min
☐ Dopamina > 15 ug/kg/min ou Noradrenalina > 0.1 ug/kg/min ou Adrenalina > 0.1 ug/kg/min

SOFA Hepático

- ☐ Bilirrubina < 1.2 mg/dL
☐ Bilirrubina 1.2 - 1.9 mg/dL
☐ Bilirrubina 2.0 - 5.9 mg/dL
☐ Bilirrubina 6.0 - 11.9 mg/dL
☐ Bilirrubina > 12.0 mg/dL

SOFA Coagulação

- ☐ Plaqueta > 150.000
☐ Plaqueta 100.000 - 149.000
☐ Plaqueta 50.000 - 99.000
☐ Plaqueta 20.000 - 49.000
☐ Plaqueta < 20.000

SOFA Renal

- ☐ Creatinina < 1.2 mg/dL
☐ Creatinina 1.2 - 1.9 mg/dL
☐ Creatinina 2.0 - 3.4 mg/dL
☐ Creatinina 3.5 - 4.9 mg/dL ou Débito Urinário < 500 ml/dia
☐ Creatinina > 5.0 mg/dL ou Débito Urinário < 200 ml/dia

Suporte Necessário Antes da Admissão a UTI

- ☐ Nenhum
☐ Reanimação Cardio-Pulmonar
☐ Droga Vasoativa
☐ Ventilação Invasiva

EXAMES LABORATORIAIS

Lactato Coletado

☐ Sim ☐ Não

Data e Hora do Lactato Coletado

Valor do Lactato

(mg/dL)

Confidential

Avaliação da Via da Necroptose em Pacientes com Sepsis
Page 22 of 27**Avaliação Diária (Paciente UTI)**

Realizado Follow-Up

☐ Sim ☐ Não

Data da Avaliação

AMOSTRAS PARA O ESTUDO

Amostra Biológica Coletada

☐ Sim ☐ Não

Data e Hora da Coleta da Amostra

Sítio de Coleta

☐ Arterial
☐ Venosa Periférica
☐ Venosa Central**SINAIS VITAIS**

Escala de Coma de Glasgow

Maior Temperatura

(°C)

Maior Frequência Cardíaca

(bpm)

Menor Pressão Arterial Sistólica

(mmHg)

Menor Pressão Arterial Média

(mmHg)

Maior Frequência Respiratória

(mpm)

Total de Fluido Recebido em 24 Horas

(Mililitros)

Diurese em 24 Horas

(Mililitros)

Balanço Hídrico em 24 Horas

(Mililitros)**SUPOORTE DE VIDA**

Necessidade de Vasopressor em Algum Momento

☐ Sim ☐ Não

Vasopressor

☐ Dopamina
☐ Dobutamina
☐ Noradrenalina
☐ Vasopressina
☐ Adrenalina

Confidential

Page 23 of 27

Dose Acumulada Diária de Dopamina	<input type="text"/>
	(ug)
Dose Acumulada Diária de Dobutamina	<input type="text"/>
	(ug)
Dose Acumulada Diária de Noradrenalina	<input type="text"/>
	(ug)
Dose Acumulada Diária de Vasopressina	<input type="text"/>
	(U)
Dose Acumulada Diária de Adrenalina	<input type="text"/>
	(ug)
Necessidade de Ventilação Mecânica Invasiva em Algum Momento	☐ Sim ☐ Não
Maior FiO2	<input type="text"/>
	(%)
Necessidade de Hemodiálise em Algum Momento	☐ Sim ☐ Não
Tipo de Hemodiálise	☐ CVVHDF ☐ Convencional

EXAMES LABORATORIAIS

Menor pH	<input type="text"/>
Maior Lactato	<input type="text"/>
	(mg/dL)
Menor Base Excess	<input type="text"/>
	(mEq/L)
Menor Bicarbonato	<input type="text"/>
	(mEq/L)
Menor PaO2	<input type="text"/>
	(mmHg)
Maior PaCO2	<input type="text"/>
	(mmHg)
Creatinina	<input type="text"/>
	(mg/dL)
Uréia	<input type="text"/>
	(mg/dL)
Maior Sódio	<input type="text"/>
	(mEq/L)
Maior Potássio	<input type="text"/>
	(mEq/L)
Leucócitos	<input type="text"/>
	(cels/mm ³)
Plaquetas	<input type="text"/>
	(10 ³ /dL)

05-02-2018 16:44

www.projectredcap.org

Confidential

Page 24 of 27

Bilirrubina Total

(mg/dL)

Confidential

Avaliação da Via da Necroptose em Pacientes com Sepsis
Page 25 of 27**Desfechos (Paciente UTI)****SOFA NA ALTA DA UTI**

SOFA Respiratório

- ☐ PaO₂ / FiO₂ > 400
☐ PaO₂ / FiO₂ < 400
☐ PaO₂ / FiO₂ < 300
☐ PaO₂ / FiO₂ < 200 e Ventilação Mecânica
☐ PaO₂ / FiO₂ < 100 e Ventilação Mecânica

SOFA Sistema Nervoso Central

- ☐ Glasgow 15
☐ Glasgow 13 - 14
☐ Glasgow 10 - 12
☐ Glasgow 6 - 9
☐ Glasgow < 6

SOFA Cardiovascular

- ☐ Sem Hipotensão
☐ Pressão Arterial Média < 70 mmHg
☐ Dopamina ≤ 5 ug/kg/min ou Dobutamina (qualquer dose)
☐ Dopamina > 5 ug/kg/min ou Noradrenalina ≤ 0.1 ug/kg/min ou Adrenalina ≤ 0.1 ug/kg/min
☐ Dopamina > 15 ug/kg/min ou Noradrenalina > 0.1 ug/kg/min ou Adrenalina > 0.1 ug/kg/min

SOFA Hepático

- ☐ Bilirrubina < 1.2 mg/dL
☐ Bilirrubina 1.2 - 1.9 mg/dL
☐ Bilirrubina 2.0 - 5.9 mg/dL
☐ Bilirrubina 6.0 - 11.9 mg/dL
☐ Bilirrubina > 12.0 mg/dL

SOFA Coagulação

- ☐ Plaqueta > 150.000
☐ Plaqueta 100.000 - 149.000
☐ Plaqueta 50.000 - 99.000
☐ Plaqueta 20.000 - 49.000
☐ Plaqueta < 20.000

SOFA Renal

- ☐ Creatinina < 1.2 mg/dL
☐ Creatinina 1.2 - 1.9 mg/dL
☐ Creatinina 2.0 - 3.4 mg/dL
☐ Creatinina 3.5 - 4.9 mg/dL ou Débito Urinário < 500 ml/dia
☐ Creatinina > 5.0 mg/dL ou Débito Urinário < 200 ml/dia

CUIDADOS PALIATIVOS

Evolução Para Cuidados Paliativos em Algum Momento

- ☐ Sim ☐ Não

Data e Hora do Início do Paliativo

DESFECHO CLÍNICO

Evolução para Seps e ou Choque Séptico em Algum Momento da Internação

☐ Sim ☐ Não

Data de Evolução Para Seps e ou Choque Séptico

Data da Alta da UTI

Destino na Alta da UTI

- ☐ Semi-Intensiva
- ☐ Ala
- ☐ Casa
- ☐ Óbito

Data da Alta da Semi-Intensiva

Destino na Alta da Semi-Intensiva

- ☐ Ala
- ☐ Casa
- ☐ Óbito

Data da Alta do Hospital

Destino na Alta do Hospital

- ☐ Casa
- ☐ Instituição de Longa Permanência
- ☐ Óbito

Status no Dia 28

- ☐ Vivo em Casa
- ☐ Vivo na UTI
- ☐ Vivo no Hospital
- ☐ Vivo em Instituição de Longa Permanência
- ☐ Óbito

Causa da Óbito

Confidential

Avaliação da Via da Necroptose em Pacientes com Sepsis
Page 27 of 27**Dados Demograficos (Controle Saudável)****INCLUSÃO**

Data de Inclusão

DADOS DEMOGRÁFICOS

Prontuário

Passagem

Data de Nascimento

Idade

(Anos)

Sexo

☐ Masculino ☐ Feminino

Peso

(Kilogramas)

Altura

(Centímetros)

Raça

☐ Negra
☐ Branca
☐ Oriental
☐ Parda

Anexo 2. Treinamento e otimização de protocolo

Avaliação de viabilidade e número de células: PBMC, *buffy coat* e granulócitos

Em relação à otimização, havia a necessidade de se calcular o tempo de cada passo do processamento, a quantidade máxima de amostras a serem processadas simultaneamente, o rendimento de células de cada subpopulação por mL de sangue e sua viabilidade, bem como testar possíveis modificações nos protocolos, adequando o fluxograma proposto. Para tanto, coletamos e processamos sangue periférico de 20 indivíduos voluntários e saudáveis. Os dados destas amostras-testes (AT) em relação à quantidade obtida de cada subpopulação bem como a viabilidade das mesmas estão compilados na figura 1. Vale ressaltar que a variabilidade inter-amostral do número de células dos indivíduos e a viabilidade destas populações estão dentro do que é normalmente observado logo após o processamento de amostras de sangue periférico.

É possível notar que as populações de PBMC e *buffy coat* da amostra AT#1 não estão representadas por erro no processamento. A separação de granulócitos começou a ter resultados satisfatórios do processamento a partir da AT#4. Não foi feita a coleta do tubo de EDTA da amostra AT#11 e, portanto, não foi possível obter a população de *buffy coat*. Na mesma amostra, foi possível coletar a população de granulócitos por conta do teste realizado no tubo Sepmate (ver abaixo). Houve um erro no processamento da amostra AT#16, que inviabilizou seu uso para a obtenção do *buffy coat*.

(A) Número de células e porcentagem (%) das amostras testes (AT) de PBMC, *buffy coat* e granulócitos submetidas a contagem pós-processamento sanguíneo (B). Mediana da viabilidade celular de PBMC (95%), *buffy coat* (92%) e granulócitos (92,5%) pós processamento.

Figura 1. Número de células e viabilidade das amostras testes (AT)

Uma das tentativas de otimização da técnica de separação de PBMC e granulócitos foi diminuir ao máximo os passos de lise das hemácias. Isto seria possível através do uso de um tubo com características específicas para este fim chamado SepMate (Stemcell). A primeira separação utilizando esta técnica teve forte impacto negativo no número de células recuperadas (10 vezes menos do que a média), como pode ser visto na figura 1 na amostra designada de AT#11. Além disso, percebemos que não é possível fazer a recuperação dos granulócitos, pois o sedimento celular abaixo desta barreira física é impossível de se acessar. A figura 2 exemplifica este problema, mostrando à esquerda o tubo SepMate (Stemcell) com as diferentes fases antes da coleta da “nuvem” de PBMC e à direita, após coleta do PBMC, com as células (granulócitos) presas na parte inferior do tubo.

À esquerda, é possível observar a separação de cada fase. À direita, o protocolo usando um tubo com barreira física, fica visível o sequestro do precipitado de hemácias e granulócitos em região do tubo inacessível, o que impede a utilização destes.

Figura 2. Protocolo de separação de PBMC utilizando o tubo SepMate

O processamento das amostras de *buffy coat*, passou por adaptações, sendo que o primeiro protocolo testado consistia na centrifugação a 1000g da amostra de sangue coletada em tubo com EDTA K3, sendo que a nuvem de células formada logo acima do sedimento de hemácias era retirada com uma pipeta Pasteur de 3mL e transferida para um tubo Falcon de 15mL. A etapa de hemólise consistia em lise com tampão ACK por 5 minutos com volume até o preenchimento do tubo e posterior lavagem com PBS. Neste primeiro protocolo testado, foi preciso realizar a repetição da etapa de lise 4 a 5 vezes até que se obtivesse o precipitado esbranquiçado. Foi observado que o tempo, quantidade do reagente e quantidade de vezes repetidas para realizar a lise de hemácias foi prejudicial para a amostra, o que resultou em uma viabilidade baixa da mesma, apresentando 83% de células viáveis (AT#2 – Figura 1A).

O protocolo foi então alterado: a rotação de centrifugação passou para 400g; foram utilizados somente 6mL do reagente ACK por 3 minutos em cada ciclo de lise, com lavagem com PBS até o preenchimento do tubo. Além disso, a centrifugação da amostra foi feita a 4°C e se adicionou o cuidado de se manter as amostras em gelo durante toda a manipulação. Esta diferença de protocolo permitiu que a quantidade de ciclos de lise fosse diminuída para duas ou três vezes, dependendo da amostra. Sendo assim, a viabilidade ficou em média 92% (Figura 1B).

A separação de granulócitos foi incluída no protocolo a partir da amostra AT#2, após discussões internas que resultaram na adição desta população

como objeto de estudo do projeto. O material utilizado foi o precipitado da primeira centrifugação do sangue em tubos com ACD-A (após a separação do PBMC). Inicialmente, testamos o protocolo de lise de hemácias com ACK e lavagem com PBS inicialmente utilizado para as amostras de *buffy coat*, usando um tubo Falcon de 50mL. O resultado ficou aquém do esperado; o precipitado formado após as centrifugações claramente apresentava problemas, muito pequeno e com vários grumos, o que inclusive impediu sua contagem adequada, mas que evidenciou uma perda quase absoluta de viabilidade celular (AT#2). O mesmo protocolo foi tentado novamente para a amostra AT#3, porém com o uso de tubo falcon de 15mL. Novamente o mesmo padrão foi observado, com o precipitado muito reduzido e com muitos grumos celulares.

O protocolo foi alterado, com as mesmas modificações feitas para a otimização de separação de *buffy coat*, sendo elas: tempo de lise para 3 minutos, quantidade do reagente ACK para 6mL, manutenção das amostras em gelo durante todo o processo, centrifugação dos granulócitos para 400g e temperatura para 4°C. Seguindo este protocolo, não foram mais observados grumos nas amostras e foi possível contar o número de células e sua viabilidade, que ficaram similares às encontradas para as amostras de PBMC.

A partir da amostra AT#13, fizemos uma nova alteração no protocolo em razão de um teste feito neste meio tempo. Percebemos que após o descongelamento desta população criopreservada por pelo menos uma semana, havia uma perda considerável de viabilidade (como exemplo a AT#10 apresentou queda de 93% para 41%). Sendo assim, ao protocolo foi adicionada uma etapa prévia aos ciclos de hemólise, que consiste na incubação na proporção de 1:1 com Dextran 6% em tubo Falcon de 50mL, seguido de repouso na estufa à 37° por 40 minutos. Após este período, foi possível ver a separação do sobrenadante mais claro, contendo os granulócitos, das hemácias sedimentadas. O sobrenadante é então transferido para um novo tubo Falcon de 15mL, prosseguindo com as fases de hemólise e lavagem, que puderam ser reduzidas em pelo menos um ciclo (dependendo da amostra, dois ciclos). Inicialmente, a viabilidade das amostras foi menor se comparado com o protocolo anterior, mas com o treinamento e otimização do método a quantidade de células foi maior (AT#13 – 20) e a viabilidade ficou na média de 92,5% (Figura 1B). Em termos de viabilidade pós-congelamento, observamos uma melhora significativa. Como exemplo,

a amostra AT#17 teve queda de viabilidade de 94% para 83% e a amostra AT#18 de 84% para 69%.

Validação da técnica de extração proteica via análise por *western blot*

Para validarmos que a extração de proteínas estava sendo feita de modo correto e também para se determinar quanto de proteína seria ideal para ser utilizada nas análises de *western blot*, fizemos a titulação utilizando o lisado proteico de PBMC da amostra AT#10 aplicando nos géis quantidades crescentes entre 10 e 30ug de proteína total. As moléculas escolhidas para esta análise foram o RIPK1 e a β -actina, por representarem uma proteína da via de necroptose e uma molécula considerada *housekeeping* (sem grandes variações de expressão), respectivamente. Como pode ser observado na figura 3A, houve a detecção das bandas específicas e de tamanho esperado.

Para nos certificar que a menor quantidade de proteínas utilizadas no experimento anterior também seria detectada com um reagente menos potente, feito de forma caseira, fizemos uma nova análise, utilizando extratos proteicos das amostras de PBMC AT#10, AT#12 e AT#16 com 10 μ g de proteína por poço (Figura 3B). A marcação foi feita com anti- β -actina e revelada com o ECL caseiro, e foram encontradas as bandas do tamanho esperado em todas as amostras.

(A) Proteínas extraídas das amostras AT#10 de PBMC, marcada com anticorpos anti-RIP1 e anti- β -actina em quantidades de proteínas de 10 μ g, 15 μ g, 20 μ g, 25 μ g e 30 μ g. (B) Proteínas extraídas com RIPA das amostras AT#10, AT#12 e AT#16 de PBMC foram quantificadas e analisadas por *western blot* com marcação do anticorpo anti- β -actina e reveladas com ECL caseiro.

Figura 3. *Western blot* de amostras de PBMC marcadas com RIPK1 e β -actina

Expressão de RIPK3 e MLKL em linhagens de HT-29 e HeLa

Como controle positivo para as marcações das proteínas de interesse nos experimentos de *western blot*, a primeira ideia foi utilizar extratos proteicos advindos de uma linhagem celular que sabidamente expresse RIPK3 e MLKL. A primeira linhagem celular testada foi HT-29, por ser uma linhagem celular sensível à indução de necroptose, sendo inclusive utilizada nos *datasheets* dos anticorpos para RIPK3 e MLKL como controle positivo. Sendo assim, o extrato proteico de HT-29 foi analisado via *western blot* conjuntamente com as amostras de PBMC AT#9 e AT#10. Inicialmente, porém, não tivemos resultados satisfatórios para a marcação com RIPK3, já que o anticorpo utilizado não resultou em nenhuma banda, nem mesmo banda inespecífica (dados não mostrados). Já em relação a MLKL, foi possível observar em todas as amostras bandas de tamanho esperado e de intensidades expressivas, principalmente nas amostras de PBMC. GAPDH foi utilizada como proteína *housekeeping*, e indica que não houve grandes variações na quantidade proteica total aplicada no gel (Figura 4). Testamos também amostras advindas de células HeLa, que não apresentaram boa marcação para nenhum dos anticorpos de interesse (dados não mostrados).

Proteínas extraídas com RIPA das amostras HT-29, AT#9 e AT#10 de PBMC foram quantificadas e analisadas por *western blot* com marcação dos anticorpos MLKL e GAPDH e reveladas com ECL.

Figura 4. *Western blot* de amostras de PBMC e HT-29 marcadas com MLKL e GAPDH

Posteriormente, com a aquisição de um outro anticorpo anti-RIPK3, novas quantificações proteicas foram realizadas para diferentes células (AT#7, AT#16 e HT-29), sendo as mesmas analisadas por *western blot* em diferentes concentrações para testar a sensibilidade e a especificidade deste novo clone (Figura 5). Assim como

o experimento anterior o GAPDH foi utilizado como proteína *housekeeping*. Felizmente, foi possível observar em todas as amostras testadas a marcação para RIPK3, de forma concentração-dependente, indicando que o problema era o anticorpo anteriormente utilizado. Portanto, após a otimização das marcações para RIPK3, MLKL e RIPK1, foi possível seguir adiante em nossos experimentos, podendo utilizar como controle positivo para os três genes tanto a célula HT-29 como um lisado proteico de PBMC de uma Amostra Teste.

Proteínas extraídas com RIPA das amostras AT#7 e AT#16 de PBMC, e HT-29, foram quantificadas e analisadas por *western blot* com marcação dos anticorpos anti-RIPK3 e anti-GAPDH e reveladas com ECL.

Figura 5. *Western blot* de amostras de PBMC e HT-29 marcadas com RIPK3 e GAPDH

Validação da pureza das subpopulações por análise por citometria

Para avaliação de pureza e viabilidade das subpopulações, tanto logo após a separação (*à fresco*) como após um período de congelamento, decidimos usar citometria de fluxo nas amostras de PBMC e granulócitos, usando como base de comparação as amostras de *buffy coat*. Utilizamos a amostra AT#17 após congelamento e a amostras AT#20 *à fresco* advindo do mesmo paciente (Figura 6). Para quantificação de viabilidade celular foi utilizado o marcador nuclear fluorescente iodeto de propídeo. Os marcadores utilizados para a identificação das principais subpopulações foram CD66b, CD3 e CD14. A análise foi iniciada pela exclusão dos *debris* e dos agregados celulares pelos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e pela área *versus* altura do parâmetro SSC, respectivamente. A seguir, as populações foram delimitadas utilizando os marcadores específicos de cada subpopulação: linfócitos (definidos por CD3+, CD14-, CD66b-), monócitos (CD14+CD3-CD66-) e granulócitos (CD66b+CD3-CD14-). Na figura suplementar 1 está a análise de exclusão de *debris*, agregados celulares e a análise da viabilidade celular.

(A) Análise por citometria de fluxo da amostra de *buffy coat* AT#17 descongelada e amostra de *buffy coat* AT#20 à fresco. Os gráficos à esquerda são de CD3.APC versus CD14.APC-Cy7, com *gates* para visualização das populações de linfócitos e monócitos. Os gráficos à direita são CD14.APC-Cy7 versus CD66b.FITC, para visualização do *gate* de granulócitos. (B) amostra de PBMC AT#17 descongelada e amostra de PBMC AT#20 à fresco. Os gráficos à esquerda são de CD3.APC versus CD14.APC-Cy7, com *gates* para visualização das populações de linfócitos e monócitos. Os gráficos à direita são CD14.APC-Cy7 versus CD66b.FITC, para visualização do *gate* de granulócitos. (C) amostra de granulócitos AT#17 descongelada e amostra de granulócitos AT#20 à fresco. Os gráficos à esquerda são de CD3.APC versus CD14.APC-Cy7, com *gates* para visualização das populações de linfócitos e monócitos. Os gráficos à direita são CD14.APC-Cy7 versus CD66b.FITC, para visualização do *gate* de granulócitos.

Figura 6. Análise por citometria de fluxo da amostra de *buffy coat*, PBMC e granulócitos

Validação do protocolo com FACS *Lysing Solution*

Ainda numa tentativa de diminuir o tempo de processamento das amostras e, com isso, facilitar a análise das subpopulações por citometria de fluxo, nos foi sugerido o uso um protocolo de análise de citometria que exclui os passos de hemólise e lavagem da amostra,⁽²³²⁾ utilizando diretamente sangue total do tubo de

EDTA K3. Neste protocolo, o sangue total é tratado com *FACS Lysing Solution* (BD Biosciences) e diretamente incubando com os anticorpos anti-CD3, anti-CD14 e anti-CD66b e após o período de incubação é adicionado PI (Figura 7). Apesar do protocolo ser rápido, fácil, resultando em poucos grumos celulares e com marcação para os anticorpos bastante intensa, ele acaba por permeabilizar quase 100% da amostra, o que impede a verificação da viabilidade celular por incorporação de iodeto de propídeo.

Amostra AT#19 a fresco submetida a protocolo alternativo de marcação para citometria de fluxo. Foram utilizados 100µL de sangue total coletado em tubo com EDTA K3, com *FACS Lysing Solution* (BD). No gráfico superior esquerdo é apresentado o perfil de tamanho e granulosidade celular. No gráfico superior direito é apresentado o *gate* para exclusão de agregados celulares. Por fim, no gráfico inferior são apresentados os *gates* de viabilidade celular, baseados na intensidade de incorporação de iodeto de propídeo (PI).

Figura 7. Análise de citometria de fluxo com sangue total - protocolo *FACS Lysing Solution*-

7 REFERÊNCIAS

1. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al.; International Forum of Acute Care Trialists. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(3):259–72.
2. Gustot T. Multiple organ failure in sepsis: prognosis and role of systemic inflammatory response. *Curr Opin Crit Care*. 2011;17(2):153–9.
3. Vincent JL. Increasing awareness of sepsis: World Sepsis Day. *Crit Care*. 2012;16(5):152.
4. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al.; Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including The Pediatric Subgroup. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med*. 2013;39(2):165–228.
5. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001;29(7):1303–10.
6. Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med*. 2013;41(5):1167–74.
7. Coopersmith CM, Wunsch H, Fink MP, Linde-Zwirble WT, Olsen KM, Sommers MS, et al. A comparison of critical care research funding and the financial burden of critical illness in the United States. *Crit Care Med*. 2012;40(4):1072–9.
8. Esteban A, Frutos-Vivar F, Ferguson ND, Peñuelas O, Lorente JA, Gordo F, et al. Sepsis incidence and outcome: contrasting the intensive care unit with the hospital ward. *Crit Care Med*. 2007;35(5):1284–9.
9. Paoli CJ, Reynolds MA, Sinha M, Gitlin M, Crouser E. Epidemiology and costs of sepsis in the United States - an analysis based on timing of diagnosis and severity level. *Crit Care Med*. 2018;46(12):1889–97.
10. Quintano Neira RA, Hamacher S, Japiassú AM. Epidemiology of sepsis in Brazil: incidence, lethality, costs, and other indicators for Brazilian Unified Health System hospitalizations from 2006 to 2015. *PLoS One*. 2018;13(4):e0195873.
11. Machado FR, Cavalcanti AB, Bozza FA, Ferreira EM, Angotti Carrara FS, Sousa JL, et al.; SPREAD Investigators; Latin American Sepsis Institute Network. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(11):1180–9.
12. Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med*. 2007;35(10):2408–16.
13. Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Crit Care Med*. 2012;40(3):754–61.

14. Ernst FR, Johnston JA, Pulgar S, He J, Ball DE, Young JK, et al. Timing of drotrecogin alfa (activated) initiation in treatment of severe sepsis: a database cohort study of hospital mortality, length of stay, and costs. *Curr Med Res Opin.* 2007;23(1):235–44.
15. Sogayar AM, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grion CM, Lobo SM, et al.; Costs Study Group - Latin American Sepsis Institute. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. *Pharmacoeconomics.* 2008;26(5):425–34.
16. Soares M, Bozza FA, Angus DC, Japiassú AM, Viana WN, Costa R, et al. Organizational characteristics, outcomes, and resource use in 78 Brazilian intensive care units: the ORCHESTRA study. *Intensive Care Med.* 2015;41(12):2149–60.
17. Stevenson EK, Rubenstein AR, Radin GT, Wiener RS, Walkey AJ. Two decades of mortality trends among patients with severe sepsis: a comparative meta-analysis. *Crit Care Med.* 2014;42(3):625–31.
18. Silva E, Pedro MA, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, et al.; Brazilian Sepsis Epidemiological Study. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care.* 2004;8(4):R251–60.
19. van Vught LA, Klein Klouwenberg PM, Spitoni C, Scicluna BP, Wiewel MA, Horn J, et al.; MARS Consortium. Incidence, risk factors, and attributable mortality of secondary infections in the intensive care unit after admission for sepsis. *JAMA.* 2016;315(14):1469–79.
20. Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol.* 2018;14(2):121–37.
21. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(3):260–8.
22. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2013;369(21):2063.
23. Bantel H, Schulze-Osthoff K. Cell death in sepsis: a matter of how, when, and where. *Crit Care.* 2009;13(4):173.
24. Rimmelé T, Payen D, Cantaluppi V, Marshall J, Gomez H, Gomez A, et al.; ADQI XIV Workgroup. Immune cell phenotype and function in sepsis. *Shock.* 2016;45(3):282–91.
25. Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(5):378–90.
26. Zonneveld R, Martinelli R, Shapiro NI, Kuijpers TW, Plötz FB, Carman CV. Soluble adhesion molecules as markers for sepsis and the potential pathophysiological discrepancy in neonates, children and adults. *Crit Care.* 2014;18(2):204.
27. Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, Guidet B, Offenstadt G. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2010;36(8):1286–98.
28. Vellinga NA, Boerma EC, Koopmans M, Donati A, Dubin A, Shapiro NI, et al.; microSOAP Study Group. International study on microcirculatory shock occurrence in acutely ill patients. *Crit Care Med.* 2015;43(1):48–56.
29. Aziz M, Jacob A, Yang WL, Matsuda A, Wang P. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. *J Leukoc Biol.* 2013;93(3):329–42.

30. Dhainaut JF, Shorr AF, Macias WL, Kollef MJ, Levi M, Reinhart K, et al. Dynamic evolution of coagulopathy in the first day of severe sepsis: relationship with mortality and organ failure. *Crit Care Med*. 2005;33(2):341–8.
31. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 2010;464(7285):104–7.
32. Gruda MC, Ruggeberg KG, O'Sullivan P, Guliashvili T, Scheirer AR, Golobish TD, et al. Broad adsorption of sepsis-related PAMP and DAMP molecules, mycotoxins, and cytokines from whole blood using CytoSorb® sorbent porous polymer beads. *PLoS One*. 2018;13(1):e0191676.
33. Hofer S, Brenner T, Bopp C, Steppan J, Lichtenstern C, Weitz J, et al. Cell death serum biomarkers are early predictors for survival in severe septic patients with hepatic dysfunction. *Crit Care*. 2009;13(3):R93.
34. Lelubre C, Vincent JL. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14(7):417–27.
35. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med*. 1999;27(7):1230–51.
36. Luan YY, Yao YM, Xiao XZ, Sheng ZY. Insights into the apoptotic death of immune cells in sepsis. *J Interferon Cytokine Res*. 2015;35(1):17–22.
37. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al.; The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*. 1992;101(6):1644–55.
38. Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change. *Lancet*. 2013;381(9868):774–5.
39. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA*. 1995;273(2):117–23.
40. Dulhunty JM, Lipman J, Finfer S; Sepsis Study Investigators for the ANZICS Clinical Trials Group. Does severe non-infectious SIRS differ from severe sepsis? Results from a multi-centre Australian and New Zealand intensive care unit study. *Intensive Care Med*. 2008;34(9):1654–61.
41. Arkader R, Troster EJ, Lopes MR, Raiz Júnior RR, Carcillo JA, Leone C, et al. Procalcitonin does discriminate between sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *Arch Dis Child*. 2006;91(2):117–20.
42. Singh VK, Wu BU, Bollen TL, Repas K, Maurer R, Morteke KJ, et al. Early systemic inflammatory response syndrome is associated with severe acute pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7(11):1247–51.
43. Tamayo E, Fernández A, Almansa R, Carrasco E, Heredia M, Lajo C, et al. Pro- and anti-inflammatory responses are regulated simultaneously from the first moments of septic shock. *Eur Cytokine Netw*. 2011;22(2):82–7.

44. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al.; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003;31(4):1250–6.
45. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801–10.
46. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al.; EPIC II Group of Investigators. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*. 2009 Dec;302(21):2323–9.
47. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*. 1996;22(7):707–10. Table 3, The SOFA score. p. 708.
48. Churpek MM, Snyder A, Han X, Sokol S, Pettit N, Howell MD, et al. Quick sepsis-related organ failure assessment, systemic inflammatory response syndrome, and early warning scores for detecting clinical deterioration in infected patients outside the intensive care unit. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195(7):906–11.
49. Song JU, Sin CK, Park HK, Shim SR, Lee J. Performance of the quick Sequential (sepsis-related) Organ Failure Assessment score as a prognostic tool in infected patients outside the intensive care unit: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2018;22(1):28.
50. Cortés-Puch I, Hartog CS. Opening the debate on the new sepsis definition change is not necessarily progress: revision of the sepsis definition should be based on new scientific insights. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194(1):16–8.
51. van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis*. 2008;8(1):32–43.
52. Conway-Morris A, Wilson J, Shankar-Hari M. Immune activation in sepsis. *Crit Care Clin*. 2018;34(1):29–42.
53. van Nassau SC, van Beek RH, Driessen GJ, Hazelzet JA, van Wering HM, Boeddha NP. Translating sepsis-3 criteria in children: prognostic accuracy of age-adjusted quick SOFA score in children visiting the emergency department with suspected bacterial infection. *Front Pediatr*. 2018;6:266.
54. Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology*. 2007;120(4):435–46.
55. Firempong AO, Shaheen MA, Pan D, Drazin D. Racial and ethnic disparities in the incidence and mortality from septic shock and respiratory failure among elective neurosurgery patients. *Neurol Res*. 2014;36(10):857–65.
56. Mayr FB, Yende S, Linde-Zwirble WT, Peck-Palmer OM, Barnato AE, Weissfeld LA, et al. Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. *JAMA*. 2010;303(24):2495–503.
57. Angele MK, Pratschke S, Hubbard WJ, Chaudry IH. Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects. *Virulence*. 2014;5(1):12–9.

58. Nasir N, Jamil B, Siddiqui S, Talat N, Khan FA, Hussain R. Mortality in sepsis and its relationship with gender. *Pak J Med Sci.* 2015;31(5):1201–6.
59. Tran DD, Groeneveld AB, van der Meulen J, Nauta JJ, Strack van Schijndel RJ, Thijs LG. Age, chronic disease, sepsis, organ system failure, and mortality in a medical intensive care unit. *Crit Care Med.* 1990;18(5):474–9.
60. Esper AM, Moss M, Lewis CA, Nisbet R, Mannino DM, Martin GS. The role of infection and comorbidity: factors that influence disparities in sepsis. *Crit Care Med.* 2006;34(10):2576–82.
61. Yang Y, Yang KS, Hsann YM, Lim V, Ong BC. The effect of comorbidity and age on hospital mortality and length of stay in patients with sepsis. *J Crit Care.* 2010;25(3):398–405.
62. Japiassú AM, Amâncio RT, Mesquita EC, Medeiros DM, Bernal HB, Nunes EP, et al. Sepsis is a major determinant of outcome in critically ill HIV/AIDS patients. *Crit Care.* 2010;14(4):R152.
63. Lopes JA, Jorge S. Sepsis as a major determinant of outcome in critically ill HIV/AIDS patients: don't forget acute kidney injury [author reply]. *Crit Care.* 2012;16(6):468.
64. Silva JM Jr, dos Santos SS. Sepsis in AIDS patients: clinical, etiological and inflammatory characteristics. *J Int AIDS Soc.* 2013;16(1):17344.
65. Abou Dagher G, El Khuri C, Chehadeh AA, Chami A, Bachir R, Zebian D, et al. Are patients with cancer with sepsis and bacteraemia at a higher risk of mortality? A retrospective chart review of patients presenting to a tertiary care centre in Lebanon. *BMJ Open.* 2017;7(3):e013502.
66. Rosolem MM, Rabello LS, Lisboa T, Caruso P, Costa RT, Leal JV, et al. Critically ill patients with cancer and sepsis: clinical course and prognostic factors. *J Crit Care.* 2012;27(3):301–7.
67. Vugia DJ, Kiehlbauch JA, Yeboue K, N'Gbichi JM, Lacina D, Maran M, et al. Pathogens and predictors of fatal septicemia associated with human immunodeficiency virus infection in Ivory Coast, west Africa. *J Infect Dis.* 1993;168(3):564–70.
68. Muthukumar R, Alexandar V, Thangam B, Ahmed SS. A systems biological approach reveals multiple crosstalk mechanism between gram-positive and negative bacterial infections: an insight into core mechanism and unique molecular signatures. *PLoS One.* 2014;9(2):e89993.
69. Hahn WO, Mikacenic C, Price BL, Harju-Baker S, Katz R, Himmelfarb J, et al. Host derived biomarkers of inflammation, apoptosis, and endothelial activation are associated with clinical outcomes in patients with bacteremia and sepsis regardless of microbial etiology. *Virulence.* 2016;7(4):387–94.
70. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003;348(16):1546–54.
71. Moldawer LL. Organ apoptosis in the septic patient: a potential therapeutic target? *Crit Care Med.* 1999;27(7):1381–2.
72. Deutschman CS. Imprecise medicine: the limitations of sepsis-3. *Crit Care Med.* 2016;44(5):857–8.
73. Briegel J, Forst H, Haller M, Schelling G, Kilger E, Kuprat G, et al. Stress doses of hydrocortisone reverse hyperdynamic septic shock: a prospective, randomized, double-blind, single-center study. *Crit Care Med.* 1999;27(4):723–32.

74. Lv QQ, Gu XH, Chen QH, Yu JQ, Zheng RQ. Early initiation of low-dose hydrocortisone treatment for septic shock in adults: a randomized clinical trial. *Am J Emerg Med*. 2017;35(12):1810–4.
75. El-Nawawy A, Khater D, Omar H, Wali Y. Evaluation of early corticosteroid therapy in management of pediatric septic shock in pediatric intensive care patients: a randomized clinical study. *Pediatr Infect Dis J*. 2017;36(2):155–9.
76. Buechler C, Pohl R, Aslanidis C. Pro-resolving molecules-new approaches to treat sepsis? *Int J Mol Sci*. 2017;18(3):E476.
77. Opal SM, Laterre PF, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira JP, et al.; ACCESS Study Group. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA*. 2013;309(11):1154–62.
78. Lorente JA, Marshall JC. Neutralization of tumor necrosis factor in preclinical models of sepsis. *Shock*. 2005;24 Suppl 1:107–19.
79. Fisher CJ Jr, Slotman GJ, Opal SM, Pribble JP, Bone RC, Emmanuel G, et al.; IL-1RA Sepsis Syndrome Study Group. Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. *Crit Care Med*. 1994;22(1):12–21.
80. Fisher CJ Jr, Dhainaut JF, Opal SM, Pribble JP, Balk RA, Slotman GJ, et al. Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *JAMA*. 1994;271(23):1836–43.
81. Macias WL, Nelson DR, Williams M, Garg R, Janes J, Sashegyi A. Lack of evidence for qualitative treatment by disease severity interactions in clinical studies of severe sepsis. *Crit Care*. 2005;9(6):R607–22.
82. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. 1997;112(1):235–43.
83. Tinsley KW, Grayson MH, Swanson PE, Drewry AM, Chang KC, Karl IE, et al. Sepsis induces apoptosis and profound depletion of splenic interdigitating and follicular dendritic cells. *J Immunol*. 2003;171(2):909–14.
84. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol*. 2002;168(5):2493–500.
85. Wang T, Derhovanessian A, De Cruz S, Belperio JA, Deng JC, Hoo GS. Subsequent infections in survivors of sepsis: epidemiology and outcomes. *J Intensive Care Med*. 2014;29(2):87–95.
86. Pinheiro da Silva F, Nizet V. Cell death during sepsis: integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. *Apoptosis*. 2009;14(4):509–21.
87. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018;25(3):486–541.

88. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239–57.
89. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol*. 2003;171(9):4672–9.
90. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995;267(5203):1456–62.
91. Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, et al. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol*. 2006;8(12):1348–58.
92. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998;94(4):481–90.
93. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*. 1996;84(2):299–308.
94. Park KJ, Lee CH, Kim A, Jeong KJ, Kim CH, Kim YS. Death receptors 4 and 5 activate Nox1 NADPH oxidase through riboflavin kinase to induce reactive oxygen species-mediated apoptotic cell death. *J Biol Chem*. 2012;287(5):3313–25.
95. Suzuki K, Kazui T, Yoshida M, Uno T, Kobayashi T, Kimura T, et al. Drug-induced apoptosis and p53, BCL-2 and BAX expression in breast cancer tissues in vivo and in fibroblast cells in vitro. *Jpn J Clin Oncol*. 1999;29(7):323–31.
96. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*. 1999;274(17):11549–56.
97. Boise LH, González-García M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, et al. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*. 1993;74(4):597–608.
98. Chao DT, Linette GP, Boise LH, White LS, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bcl-XL and Bcl-2 repress a common pathway of cell death. *J Exp Med*. 1995;182(3):821–8.
99. Huang DC, Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*. 2000;103(6):839–42.
100. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell*. 1998;1(7):949–57.
101. Fu Q, Fu TM, Cruz AC, Sengupta P, Thomas SK, Wang S, et al. Structural basis and functional role of intramembrane trimerization of the Fas/CD95 death receptor. *Mol Cell*. 2016;61(4):602–13.
102. Nagata S, Tanaka M. Programmed cell death and the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(5):333–40.
103. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*. 1992;148(7):2207–16.

104. Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*. 1992;358(6382):167–9.
105. Edgeworth JD, Spencer J, Phalipon A, Griffin GE, Sansonetti PJ. Cytotoxicity and interleukin-1 β processing following *Shigella flexneri* infection of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2002;32(5):1464–71.
106. Kang SJ, Wang S, Hara H, Peterson EP, Namura S, Amin-Hanjani S, et al. Dual role of caspase-11 in mediating activation of caspase-1 and caspase-3 under pathological conditions. *J Cell Biol*. 2000;149(3):613–22.
107. Aachoui Y, Sagulenko V, Miao EA, Stacey KJ. Inflammasome-mediated pyroptotic and apoptotic cell death, and defense against infection. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16(3):319–26.
108. Wang Y, Gao W, Shi X, Ding J, Liu W, He H, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature*. 2017;547(7661):99–103.
109. Brough D, Rothwell NJ. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1 β is cytosolic and precedes cell death. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 5):772–81.
110. Mulvihill E, Sborgi L, Mari SA, Pfreundschuh M, Hiller S, Müller DJ. Mechanism of membrane pore formation by human gasdermin-D. *EMBO J*. 2018;37(14):e98321.
111. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*. 2011;479(7371):117–21.
112. Doitsh G, Galloway NL, Geng X, Yang Z, Monroe KM, Zepeda O, et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature*. 2014;505(7484):509–14.
113. Kofahi HM, Taylor NG, Hirasawa K, Grant MD, Russell RS, Hepatitis C. Hepatitis C virus infection of cultured human hepatoma cells causes apoptosis and pyroptosis in both infected and bystander cells. *Sci Rep*. 2016;6(1):37433.
114. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*. 2005;1(2):112–9.
115. Dickens LS, Powley IR, Hughes MA, MacFarlane M. The ‘complexities’ of life and death: death receptor signalling platforms. *Exp Cell Res*. 2012;318(11):1269–77.
116. Oberst A, Dillon CP, Weinlich R, McCormick LL, Fitzgerald P, Pop C, et al. Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature*. 2011;471(7338):363–7.
117. Green DR, Oberst A, Dillon CP, Weinlich R, Salvesen GS. RIPK-dependent necrosis and its regulation by caspases: a mystery in five acts. *Mol Cell*. 2011;44(1):9–16.
118. Rodriguez DA, Weinlich R, Brown S, Guy C, Fitzgerald P, Dillon CP, et al. Characterization of RIPK3-mediated phosphorylation of the activation loop of MLKL during necroptosis. *Cell Death Differ*. 2016;23(1):76–88.
119. Weinlich R, Dillon CP, Green DR. Ripped to death. *Trends Cell Biol*. 2011;21(11):630–7.
120. Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *N Engl J Med*. 2014;370(5):455–65.

121. Orzalli MH, Kagan JC. Apoptosis and necroptosis as host defense strategies to prevent viral infection. *Trends Cell Biol.* 2017;27(11):800–9.
122. Upton JW, Kaiser WJ, Mocarski ES. DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIP3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA. *Cell Host Microbe.* 2012;11(3):290–7.
123. Lalaoui N, Brumatti G. Relevance of necroptosis in cancer. *Immunol Cell Biol.* 2017;95(2):137–45.
124. Fulda S. Therapeutic exploitation of necroptosis for cancer therapy. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;35:51–6.
125. Steinhart L, Belz K, Fulda S. Smac mimetic and demethylating agents synergistically trigger cell death in acute myeloid leukemia cells and overcome apoptosis resistance by inducing necroptosis. *Cell Death Dis.* 2013;4(9):e802.
126. Weinlich R, Green DR. The two faces of receptor interacting protein kinase-1. *Mol Cell.* 2014;56(4):469–80.
127. Weinlich R, Oberst A, Beere HM, Green DR. Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(2):127–36.
128. Kearney CJ, Martin SJ. An inflammatory perspective on necroptosis. *Mol Cell.* 2017;65(6):965–73.
129. Newton K, Sun X, Dixit VM. Kinase RIP3 is dispensable for normal NF-kappa Bs, signaling by the B-cell and T-cell receptors, tumor necrosis factor receptor 1, and Toll-like receptors 2 and 4. *Mol Cell Biol.* 2004;24(4):1464–9.
130. Koo GB, Morgan MJ, Lee DG, Kim WJ, Yoon JH, Koo JS, et al. Methylation-dependent loss of RIP3 expression in cancer represses programmed necrosis in response to chemotherapeutics. *Cell Res.* 2015;25(6):707–25.
131. He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell.* 2009;137(6):1100–11.
132. Oerlemans MI, Liu J, Arslan F, den Ouden K, van Middelaar BJ, Doevendans PA, et al. Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo. *Basic Res Cardiol.* 2012;107(4):270.
133. Linkermann A, Bräsen JH, Himmerkus N, Liu S, Huber TB, Kunzendorf U, et al. Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int.* 2012;81(8):751–61.
134. Linkermann A, Bräsen JH, Darding M, Jin MK, Sanz AB, Heller JO, et al. Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(29):12024–9.
135. Meng L, Jin W, Wang X. RIP3-mediated necrotic cell death accelerates systematic inflammation and mortality. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(35):11007–12.
136. Deutsch M, Graffeo CS, Rokosh R, Pansari M, Ochi A, Levie EM, et al. Divergent effects of RIP1 or RIP3 blockade in murine models of acute liver injury. *Cell Death Dis.* 2015;6(5):e1759.

137. Gautheron J, Vucur M, Reisinger F, Cardenas DV, Roderburg C, Koppe C, et al. A positive feedback loop between RIP3 and JNK controls non-alcoholic steatohepatitis. *EMBO Mol Med*. 2014;6(8):1062–74.
138. Moriwaki K, Balaji S, McQuade T, Malhotra N, Kang J, Chan FK. The necroptosis adaptor RIPK3 promotes injury-induced cytokine expression and tissue repair. *Immunity*. 2014;41(4):567–78.
139. Murakami Y, Matsumoto H, Roh M, Giani A, Kataoka K, Morizane Y, et al. Programmed necrosis, not apoptosis, is a key mediator of cell loss and DAMP-mediated inflammation in dsRNA-induced retinal degeneration. *Cell Death Differ*. 2014;21(2):270–7.
140. Kafa IM, Uysal M, Bakirci S, Ayberk Kurt M. Sepsis induces apoptotic cell death in different regions of the brain in a rat model of sepsis. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2010;70(3):246–60.
141. Chung CS, Venet F, Chen Y, Jones LN, Wilson DC, Ayala CA, et al. Deficiency of Bid protein reduces sepsis-induced apoptosis and inflammation, while improving septic survival. *Shock*. 2010;34(2):150–61.
142. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(11):813–22.
143. Cabrera-Perez J, Condotta SA, Badovinac VP, Griffith TS. Impact of sepsis on CD4 T cell immunity. *J Leukoc Biol*. 2014;96(5):767–77.
144. Monneret G, Venet F, Kullberg BJ, Netea MG. ICU-acquired immunosuppression and the risk for secondary fungal infections. *Med Mycol*. 2011;49(49 Suppl 1):S17–23.
145. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat Med*. 2009;15(5):496–7.
146. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*. 2011;306(23):2594–605.
147. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, et al.; Inflammation and Host Response to Injury Large-Scale Collaborative Research Program. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med*. 2011;208(13):2581–90.
148. Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Feb;163(2):316–21.
149. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmieg RE Jr, Hui JJ, Chang KC, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol*. 2001;166(11):6952–63.
150. Hotchkiss RS, Swanson PE, Cobb JP, Jacobson A, Buchman TG, Karl IE. Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. *Crit Care Med*. 1997;25(8):1298–307.
151. Wang SD, Huang KJ, Lin YS, Lei HY. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J Immunol*. 1994;152(10):5014–21.
152. Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC, Wagner TH, Coopersmith CM, Karl IE. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J Immunol*. 2005;174(8):5110–8.

153. Peck-Palmer OM, Unsinger J, Chang KC, McDonough JS, Perlman H, McDunn JE, et al. Modulation of the Bcl-2 family blocks sepsis-induced depletion of dendritic cells and macrophages. *Shock*. 2009;31(4):359–66.
154. Peck-Palmer OM, Unsinger J, Chang KC, Davis CG, McDunn JE, Hotchkiss RS. Deletion of MyD88 markedly attenuates sepsis-induced T and B lymphocyte apoptosis but worsens survival. *J Leukoc Biol*. 2008;83(4):1009–18.
155. Wang YC, Liu QX, Liu T, Xu XE, Gao W, Bai XJ, et al. Caspase-1-dependent pyroptosis of peripheral blood mononuclear cells predicts the development of sepsis in severe trauma patients: a prospective observational study. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(8):e9859.
156. Chen KW, Groß CJ, Sotomayor FV, Stacey KJ, Tschopp J, Sweet MJ, et al. The neutrophil NLRC4 inflammasome selectively promotes IL-1 β maturation without pyroptosis during acute *Salmonella* challenge. *Cell Rep*. 2014;8(2):570–82.
157. Man SM, Karki R, Briard B, Burton A, Gingras S, Pelletier S, et al. Differential roles of caspase-1 and caspase-11 in infection and inflammation. *Sci Rep*. 2017;7(1):45126.
158. Dolinay T, Kim YS, Howrylak J, Hunninghake GM, An CH, Fredenburgh L, et al. Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(11):1225–34.
159. Linkermann A, Bräsen JH, De Zen F, Weinlich R, Schwendener RA, Green DR, et al. Dichotomy between RIP1- and RIP3-mediated necroptosis in tumor necrosis factor- α -induced shock. *Mol Med*. 2012;18(4):577–86.
160. Duprez L, Takahashi N, Van Hauwermeiren F, Vandendriessche B, Goossens V, Vanden Berghe T, et al. RIP kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome. *Immunity*. 2011;35(6):908–18.
161. Cui YL, Qiu LH, Zhou SY, Li LF, Qian ZZ, Liu XM, et al. Necroptosis as a potential therapeutic target in multiple organ dysfunction syndrome. *Oncotarget*. 2017;8(34):56980–90.
162. Hansen LW, Jacob A, Yang WL, Bolognese AC, Prince J, Nicastro JM, et al. Deficiency of receptor-interacting protein kinase 3 (RIPK3) attenuates inflammation and organ injury in neonatal sepsis. *J Pediatr Surg*. 2018;53(9):1699–705.
163. Newton K, Dugger DL, Maltzman A, Greve JM, Hedehus M, Martin-McNulty B, et al. RIPK3 deficiency or catalytically inactive RIPK1 provides greater benefit than MLKL deficiency in mouse models of inflammation and tissue injury. *Cell Death Differ*. 2016;23(9):1565–76.
164. Vucur M, Roderburg C, Kaiser L, Schneider AT, Roy S, Loosen SH, et al. Elevated serum levels of mixed lineage kinase domain-like protein predict survival of patients during intensive care unit treatment. *Dis Markers*. 2018;2018:1983421.
165. Wang B, Li J, Gao HM, Xing YH, Lin Z, Li HJ, et al. Necroptosis regulated proteins expression is an early prognostic biomarker in patient with sepsis: a prospective observational study. *Oncotarget*. 2017;8(48):84066–73.
166. Ma KC, Schenck EJ, Siempos II, Cloonan SM, Finkelsztejn EJ, Pabon MA, et al. Circulating RIPK3 levels are associated with mortality and organ failure during critical illness. *JCI Insight*. 2018;3(13):99692.

167. Schenck EJ, Ma KC, Price DR, Nicholson T, Oromendia C, Gentzler ER, et al. Circulating cell death biomarker TRAIL is associated with increased organ dysfunction in sepsis. *JCI Insight*. 2019;4(9):127143.
168. Riedhammer C, Halbritter D, Weissert R. Peripheral blood mononuclear cells: isolation, freezing, thawing, and culture. *Methods Mol Biol*. 2016;1304:53–61.
169. Quach A, Ferrante A. The application of dextran sedimentation as an initial step in neutrophil purification promotes their stimulation, due to the presence of monocytes. *J Immunol Res*. 2017;2017:1254792.
170. Dagur PK, McCoy JP. Collection, storage, and preparation of human blood cells. *Curr Protoc Cytom*. 2015;73:5.1.1-16.
171. Yusef D, Shalakhti T, Awad S, Algharaibeh H, Khasawneh W. Clinical characteristics and epidemiology of sepsis in the neonatal intensive care unit in the era of multi-drug resistant organisms: a retrospective review. *Pediatr Neonatol*. 2018;59(1):35–41.
172. Karon BS, Tolan NV, Wockenfus AM, Block DR, Baumann NA, Bryant SC, et al. Evaluation of lactate, white blood cell count, neutrophil count, procalcitonin and immature granulocyte count as biomarkers for sepsis in emergency department patients. *Clin Biochem*. 2017;50(16-17):956–8.
173. Milot E, Filep JG. Regulation of neutrophil survival/apoptosis by Mcl-1. *ScientificWorldJournal*. 2011;11:1948–62.
174. Ryoo SM, Han KS, Ahn S, Shin TG, Hwang SY, Chung SP, et al.; Korean Shock Society (KoSS) Investigators. The usefulness of C-reactive protein and procalcitonin to predict prognosis in septic shock patients: a multicenter prospective registry-based observational study. *Sci Rep*. 2019;9(1):6579.
175. Kelly-Scumpia KM, Scumpia PO, Weinstein JS, Delano MJ, Cuenca AG, Nacionales DC, et al. B cells enhance early innate immune responses during bacterial sepsis. *J Exp Med*. 2011;208(8):1673–82.
176. Gustave CA, Gossez M, Demaret J, Rimmelé T, Lepape A, Malcus C, et al. Septic shock shapes B cell response toward an exhausted-like/immunoregulatory profile in patients. *J Immunol*. 2018;200(7):2418–25.
177. Monserrat J, de Pablo R, Diaz-Martín D, Rodríguez-Zapata M, de la Hera A, Prieto A, et al. Early alterations of B cells in patients with septic shock. *Crit Care*. 2013;17(3):R105.
178. Vaughan AT, Roghanian A, Cragg MS. B cells—masters of the immunoverse. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43(3):280–5.
179. Holub M, Klucková Z, Beneda B, Hobstová J, Huzicka I, Prazák J, et al. Changes in lymphocyte subpopulations and CD3+/DR+ expression in sepsis. *Clin Microbiol Infect*. 2000;6(12):657–60.
180. Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. Raising the NKT cell family. *Nat Immunol*. 2010;11(3):197–206.
181. Cortesi F, Delfanti G, Casorati G, Dellabona P. The pathophysiological relevance of the iNKT cell/mononuclear phagocyte crosstalk in tissues. *Front Immunol*. 2018;9:2375.

182. Reilly EC, Wands JR, Brossay L. Cytokine dependent and independent iNKT cell activation. *Cytokine*. 2010;51(3):227–31.
183. Chen GB, Tang ZH, Bai XJ. Variation and significance of NKT cell and its subset in patients with severe multiple injuries. *Chin J Traumatol*. 2009;12(6):323–7.
184. Boomer JS, Shuherk-Shaffer J, Hotchkiss RS, Green JM. A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit Care*. 2012;16(3):R112.
185. Venet F, Davin F, Guignant C, Larue A, Cazalis MA, Darbon R, et al. Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock*. 2010;34(4):358–63.
186. Holub M, Klucková Z, Helcl M, Příhodov J, Rokyta R, Beran O. Lymphocyte subset numbers depend on the bacterial origin of sepsis. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9(3):202–11.
187. Andaluz-Ojeda D, Iglesias V, Bobillo F, Almansa R, Rico L, Gandía F, et al. Early natural killer cell counts in blood predict mortality in severe sepsis. *Crit Care*. 2011;15(5):R243.
188. von Muller L, Klemm A, Durmus N, Weiss M, Suger-Wiedeck H, Schneider M, et al. Cellular immunity and active human cytomegalovirus infection in patients with septic shock. *J Infect Dis*. 2007;196(9):1288–95.
189. Giamarellos-Bourboulis EJ, Tsaganos T, Spyridaki E, Mouktaroudi M, Plachouras D, Vaki I, et al. Early changes of CD4-positive lymphocytes and NK cells in patients with severe Gram-negative sepsis. *Crit Care*. 2006;10(6):R166.
190. Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: validation in sepsis and systemic lupus erythematosus. *Sci Rep*. 2015;5(1):13886.
191. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol*. 2010;28(1):445–89.
192. Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*. 1997;112(6 Suppl):321S–9S.
193. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(11):2563–82.
194. de Bont ES, Martens A, van Raan J, Samson G, Fetter WP, Okken A, et al. Diagnostic value of plasma levels of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and interleukin-6 (IL-6) in newborns with sepsis. *Acta Paediatr*. 1994;83(7):696–9.
195. Aikawa N. [Cytokine storm in the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome associated with surgical insults]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*. 1996;97(9):771–7. Japanese.
196. Pruitt JH, Copeland EM 3rd, Moldawer LL. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism in sepsis, systemic inflammatory response syndrome, and septic shock. *Shock*. 1995;3(4):235–51.
197. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011;117(14):3720–32.
198. Martin SJ. Cell death and inflammation: the case for IL-1 family cytokines as the canonical DAMPs of the immune system. *FEBS J*. 2016;283(14):2599–615.

199. Vanden Berghe T, Demon D, Bogaert P, Vandendriessche B, Goethals A, Depuydt B, et al. Simultaneous targeting of IL-1 and IL-18 is required for protection against inflammatory and septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(3):282–91.
200. Mosley B, Dower SK, Gillis S, Cosman D. Determination of the minimum polypeptide lengths of the functionally active sites of human interleukins 1 alpha and 1 beta. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84(13):4572–6.
201. England H, Summersgill HR, Edye ME, Rothwell NJ, Brough D. Release of interleukin-1 α or interleukin-1 β depends on mechanism of cell death. *J Biol Chem*. 2014;289(23):15942–50.
202. Anders HJ. Of Inflammasomes and Alarmins: IL-1 β and IL-1 α in Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(9):2564–75.
203. Kay AB, Barata L, Meng Q, Durham SR, Ying S. Eosinophils and eosinophil-associated cytokines in allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997;113(1-3):196–9.
204. Lutz MB, Schnare M, Menges M, Rössner S, Röllinghoff M, Schuler G, et al. Differential functions of IL-4 receptor types I and II for dendritic cell maturation and IL-12 production and their dependency on GM-CSF. *J Immunol*. 2002;169(7):3574–80.
205. Baumhofer JM, Beinhauer BG, Wang JE, Brandmeier H, Geissler K, Losert U, et al. Gene transfer with IL-4 and IL-13 improves survival in lethal endotoxemia in the mouse and ameliorates peritoneal macrophages immune competence. *Eur J Immunol*. 1998;28(2):610–5.
206. Loke P, Nair MG, Parkinson J, Guiliano D, Blaxter M, Allen JE. IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. *BMC Immunol*. 2002;3(1):7.
207. Foucras G, Gapin L, Coureau C, Kanellopoulos JM, Guéry JC. Interleukin 4-producing CD4 T cells arise from different precursors depending on the conditions of antigen exposure in vivo. *J Exp Med*. 2000;191(4):683–94.
208. Levings MK, Schrader JW. IL-4 inhibits the production of TNF-alpha and IL-12 by STAT6-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol*. 1999;162(9):5224–9.
209. Surbatovic M, Filipovic N, Radakovic S, Stankovic N, Slavkovic Z. Immune cytokine response in combat casualties: blast or explosive trauma with or without secondary sepsis. *Mil Med*. 2007;172(2):190–5.
210. Wu HP, Wu CL, Chen CK, Chung K, Tseng JC, Liu YC, et al. The interleukin-4 expression in patients with severe sepsis. *J Crit Care*. 2008;23(4):519–24.
211. Nascimento DC, Melo PH, Piñeros AR, Ferreira RG, Colón DF, Donate PB, et al. IL-33 contributes to sepsis-induced long-term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. *Nat Commun*. 2017;8(1):14919.
212. Pecaric-Petkovic T, Didichenko SA, Kaempfer S, Spiegl N, Dahinden CA. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood*. 2009;113(7):1526–34.
213. Cohen J. Mechanisms of tissue injury in sepsis: contrasts between gram positive and gram negative infection. *J Chemother*. 2001;13 Spec No 1(1):153-8.
214. Mera S, Tatulescu D, Cismaru C, Bondor C, Slavcovici A, Zanc V, et al. Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. *APMIS*. 2011;119(2):155–63.

215. Capobianchi MR, Abbate I, Antonelli G, Turriziani O, Dolei A, Dianzani F. Inhibition of HIV type 1 BaL replication by MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES in macrophages. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998;14(3):233–40.
216. Fahey TJ 3rd, Tracey KJ, Tekamp-Olson P, Cousens LS, Jones WG, Shires GT, et al. Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J Immunol*. 1992;148(9):2764–9.
217. Schall TJ, Bacon K, Camp RD, Kaspari JW, Goeddel DV. Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J Exp Med*. 1993;177(6):1821–6.
218. Cocchi F, DeVico AL, Yarchoan R, Redfield R, Cleghorn F, Blattner WA, et al. Higher macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta levels from CD8+ T cells are associated with asymptomatic HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(25):13812–7.
219. McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubes P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe*. 2012;12(3):324–33.
220. Petri B, Phillipson M, Kubes P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *J Immunol*. 2008;180(10):6439–46.
221. Su Y, Lei X, Wu L, Liu L. The role of endothelial cell adhesion molecules P-selectin, E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in leucocyte recruitment induced by exogenous methylglyoxal. *Immunology*. 2012;137(1):65–79.
222. Cummings CJ, Sessler CN, Beall LD, Fisher BJ, Best AM, Fowler AA 3rd. Soluble E-selectin levels in sepsis and critical illness. Correlation with infection and hemodynamic dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(2 Pt 1):431–7.
223. Luo J, Paranya G, Bischoff J. Noninflammatory expression of E-selectin is regulated by cell growth. *Blood*. 1999;93(11):3785–91.
224. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*. 1995;270(45):27348–57.
225. Groom JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol*. 2011;89(2):207–15.
226. Chan T, Gu F. Early diagnosis of sepsis using serum biomarkers. *Expert Rev Mol Diagn*. 2011;11(5):487–96.
227. Stiles LN, Liu MT, Kane JA, Lane TE. CXCL10 and trafficking of virus-specific T cells during coronavirus-induced demyelination. *Autoimmunity*. 2009;42(6):484–91.
228. Herzig DS, Driver BR, Fang G, Toliver-Kinsky TE, Shute EN, Sherwood ER. Regulation of lymphocyte trafficking by CXC chemokine receptor 3 during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(3):291–300.
229. Herzig DS, Guo Y, Fang G, Toliver-Kinsky TE, Sherwood ER. Therapeutic efficacy of CXCR3 blockade in an experimental model of severe sepsis. *Crit Care*. 2012;16(5):R168.

230. Punyadeera C, Schneider EM, Schaffer D, Hsu HY, Joos TO, Kriebel F, et al. A biomarker panel to discriminate between systemic inflammatory response syndrome and sepsis and sepsis severity. *J Emerg Trauma Shock*. 2010;3(1):26–35.
231. Chen HL, Hung CH, Tseng HI, Yang RC, Chen HL, Hung CH, et al. Plasma IP-10 as a predictor of serious bacterial infection in infants less than 4 months of age. *J Trop Pediatr*. 2011;57(2):145–51.
232. Menéndez P, Redondo O, Rodriguez A, Lopez-Berges MC, Ercilla G, López A, et al. Comparison between a lyse-and-then-wash method and a lyse-non-wash technique for the enumeration of CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Cytometry*. 1998;34(6):264–71.

Abstract

Introduction: Sepsis is considered a serious condition and this disease is characterized by a generalized infection that causes an acute systemic inflammatory response, and lead to death in approximately 30% of cases. Despite the recent findings, the mechanisms involved in the initiation and progression of sepsis have not yet been fully elucidated, making the treatment a challenging. One of characteristics of this disease is the massive death of cells of immune system. Necroptosis, a recently discovered cell death pathway, has high inflammatory potential and is already associated with several inflammatory and infectious diseases. In animal model of sepsis, mice deficient in components of the necroptosis pathway or treated with pharmacological inhibitors against this pathway presented lower mortality as well as fewer and less intense organic dysfunctions, indicating that necroptosis contributes to the deleterious effects of this condition. **Purpose:** To investigate whether there is an increase in the expression levels of necroptotic molecules in peripheral blood cells of patients with sepsis/septic shock compared with patients from control group without infection and who were hospitalized in the ICU. We also analyzed if the intensity of the activation of this cell death pathway correlates with different groups or with the severity of the disease, and investigated changes in the immune cellular component of the peripheral blood of these patients as well as the expression of cytokines and chemokines. **Methods:** We collected peripheral blood samples from 80 patients who were divided into the following different experimental groups: healthy control, ICU control, sepsis, septic shock and Luminex analysis, flow cytometry, qPCR and western blot. **Results:** Of the sample, plasmatic RIPK3, cytokines and chemokines with IL-4, IP-10 (CXCL 10), IL-8, MIP-1 beta, IL-1 alpha and E-selectin presented differential expression with $p < 0.0001$ values compared with sepsis and non-sepsis groups. Differences in the percentages of monocytes, NK and NKT cells were observed using the flow cytometry within different experimental groups, raising the possibility of using these immune populations as biomarkers for segregating the groups. Opposed to the initial hypothesis, in this cohort study the transcriptional levels of RIPK3 and MLKL did not vary significantly among the groups. Interestingly, there was only a slight reduction in MLKL protein levels in septic patients than in the control group, which does not point out to an increased sensitivity of PBMC from septic patients towards necroptosis.

Conclusion: In this pilot study, differences in circulating RIPK3, plasma cytokine and chemokine expression and percentages of immune cell subpopulations in peripheral blood were identified between sepsis patients and the control group. However, contrary to expectations, we did not observe significant changes in RIPK3 and MLKL intracellular levels.

Keywords: RIPK3; MLKL; Necroptose; Sepsis; Septic shock

Apêndices

Apêndice 1. Compilação de todas as amostras de PBMC, *buffy coat* e granulócitos incluídas no projeto preconizando o número de células e a viabilidade celular

ID	Dia	Data	Viabilidade PBMC	Nº de células	Viabilidade Buffy coat	Nº de células	Viabilidade GNL	Nº de células
001	D0	26/02/2018	91%	$6,86 \times 10^6$	96%	$9,21 \times 10^6$	96%	$1,52 \times 10^7$
002	D0	27/02/2018	94%	$1,61 \times 10^7$	95%	$2,11 \times 10^7$	80%	$1,94 \times 10^6$
003	D0	27/02/2018	97%	$1,73 \times 10^7$	96%	$1,11 \times 10^7$	91%	$3,40 \times 10^6$
004	D0	27/02/2018	98%	$3,45 \times 10^7$	94%	$1,78 \times 10^7$	89%	$2,76 \times 10^6$
005	D0	27/02/2018	82%	$7,68 \times 10^6$	97%	$1,42 \times 10^7$	95%	$7,39 \times 10^6$
005	D3	02/03/2018	94%	$1,28 \times 10^6$	92%	$6,45 \times 10^6$	92%	$5,40 \times 10^6$
005	D7	06/03/2018	98%	$9,56 \times 10^6$	92%	$6,57 \times 10^6$	90%	$7,27 \times 10^6$
006	D0	28/02/2018	96%	$1,92 \times 10^7$	92%	$1,22 \times 10^7$	95%	$8,03 \times 10^6$
007	D0	28/02/2018	95%	$2,78 \times 10^7$	96%	$2,18 \times 10^7$	86%	$1,47 \times 10^6$
008	D0	01/03/2018	95%	$1,73 \times 10^7$	95%	$1,57 \times 10^7$	96%	$1,43 \times 10^7$
009	D0	01/03/2018	95%	$2,30 \times 10^7$	95%	$1,25 \times 10^7$	95%	$9,44 \times 10^6$
010	D0	09/03/2018	81%	$5,92 \times 10^6$	91%	$1,37 \times 10^7$	98%	$4,68 \times 10^7$
011	D0	12/03/2018	84%	$7,87 \times 10^6$	85%	$5,16 \times 10^6$	93%	$3,22 \times 10^7$
012	D0	13/03/2018	95%	$1,10 \times 10^7$	95%	$2,04 \times 10^7$	96%	$2,11 \times 10^7$
012	D3	16/03/2018	96%	$1,00 \times 10^7$	96%	$1,81 \times 10^7$	95%	$2,27 \times 10^7$
013	D0	13/03/2018	90%	$4,34 \times 10^6$	97%	$2,74 \times 10^7$	97%	$4,60 \times 10^7$
013	D3	16/03/2018	97%	$5,81 \times 10^6$	91%	$8,86 \times 10^6$	94%	$1,03 \times 10^7$
014	D0	15/03/2018	94 %	$1,26 \times 10^7$	92%	$6,98 \times 10^6$	81%	$1,47 \times 10^6$
015	D0	15/03/2018	90%	$1,24 \times 10^7$	91%	$1,01 \times 10^7$	83%	$5,92 \times 10^6$
016	D0	26/03/2018	91%	$2,42 \times 10^7$	90%	$3,23 \times 10^6$	93%	$2,46 \times 10^7$
017	D0	27/03/2018	96%	$1,78 \times 10^7$	94%	$1,13 \times 10^7$	87%	$1,52 \times 10^6$
018	D0	02/04/2018	91%	$9,79 \times 10^6$	90%	$5,45 \times 10^6$	81%	$1,23 \times 10^6$
019	D0	02/04/2018	93%	$2,35 \times 10^7$	96%	$1,54 \times 10^7$	93%	$1,75 \times 10^7$
020	D0	03/04/2018	93%	$1,83 \times 10^7$	98%	$2,76 \times 10^6$	83%	$1,70 \times 10^6$
021	D0	03/04/2018	93%	$1,29 \times 10^7$	94%	$1,94 \times 10^6$	96%	$1,21 \times 10^7$
022	D0	04/04/2018	96%	$1,32 \times 10^7$	94%	$1,45 \times 10^7$	93%	$1,89 \times 10^7$
023	D0	04/04/2018	97%	$2,50 \times 10^7$	91%	$6,64 \times 10^7$	91%	$6,15 \times 10^7$
023	D3	07/04/2018	95%	$1,60 \times 10^7$	90%	$1,16 \times 10^7$	87%	$3,46 \times 10^6$
023	D7	11/04/2018	94%	$1,18 \times 10^7$	90%	$2,30 \times 10^7$	92%	$2,87 \times 10^6$
024	D0	05/04/2018	91%	$1,69 \times 10^7$	94%	$1,24 \times 10^7$	94%	$1,96 \times 10^7$
025	D0	05/04/2018	90%	$1,08 \times 10^7$	90%	$3,69 \times 10^6$	75%	$2,52 \times 10^5$
026	D0	06/04/2018	94%	$1,30 \times 10^7$	93%	$1,50 \times 10^7$	91%	$1,21 \times 10^7$
027	D0	06/04/2018	93%	$2,23 \times 10^7$	93%	$3,35 \times 10^7$	90%	$7,8 \times 10^7$
028	D0	07/04/2018	90%	$2,01 \times 10^7$	91%	$9,91 \times 10^6$	91%	$1,60 \times 10^7$
029	D0	09/04/2018	95%	$1,98 \times 10^7$	91%	$1,85 \times 10^7$	92%	$1,30 \times 10^7$
029	D3	12/04/2018	94%	$1,71 \times 10^7$	94%	$1,44 \times 10^7$	90%	$6,57 \times 10^6$
030	D0	09/04/2018	91%	$1,06 \times 10^7$	93%	$1,67 \times 10^7$	92%	$2,01 \times 10^6$
030	D3	12/04/2018	90%	$1,25 \times 10^7$	92%	$5,24 \times 10^7$	94%	$1,27 \times 10^7$
030	D7	17/04/2018	92%	$1,11 \times 10^7$	95%	$1,20 \times 10^7$	95%	$2,16 \times 10^7$
030	D14	23/04/2018	91%	$1,88 \times 10^7$	93%	$8,56 \times 10^6$	90%	$2,69 \times 10^7$
031	D0	11/04/2018	90%	$1,13 \times 10^7$	93%	$2,33 \times 10^7$	91%	$4,40 \times 10^6$

continua...

...continuação

032	D0	11/04/2018	93%	$2,11 \times 10^7$	94%	$3,41 \times 10^7$	90%	$5,13 \times 10^7$
033	D0	13/04/2018	92%	$1,28 \times 10^7$	95%	$1,00 \times 10^7$	92%	$1,14 \times 10^7$
034	D0	17/04/2018	93%	$3,35 \times 10^7$	93%	$5,35 \times 10^7$	90%	$1,18 \times 10^8$
034	D3	20/04/2018	93%	$1,85 \times 10^7$	93%	$3,91 \times 10^7$	90%	$6,30 \times 10^7$
035	D0	23/04/2018	93%	$4,40 \times 10^7$	91%	$1,81 \times 10^7$	90%	$1,39 \times 10^7$
035	D3	26/04/2018	90%	$3,78 \times 10^7$	92%	$1,88 \times 10^7$	92%	$1,24 \times 10^7$
036	D0	23/04/2018	90%	$9,56 \times 10^6$	92%	$2,22 \times 10^7$	93%	$5,21 \times 10^7$
036	D3	26/04/2018	91%	$1,34 \times 10^7$	92%	$1,37 \times 10^7$	93%	$1,07 \times 10^7$
037	D0	24/04/2018	91%	$6,10 \times 10^6$	92%	$1,49 \times 10^7$	90%	$1,54 \times 10^7$
038	D0	25/04/2018	92%	$2,36 \times 10^7$	94%	$4,49 \times 10^7$	94%	$7,64 \times 10^7$
038	D3	28/04/2018	90%	$1,08 \times 10^7$	90%	$2,74 \times 10^7$	89%	$2,90 \times 10^7$
039	D0	25/04/2018	90%	$1,56 \times 10^7$	97%	$3,22 \times 10^7$	89%	$4,80 \times 10^7$
039	D3	28/04/2018	91%	$1,15 \times 10^7$	91%	$3,01 \times 10^7$	90%	$5,02 \times 10^7$
039	D7	02/05/2018	89%	$1,56 \times 10^7$	90%	$1,74 \times 10^7$	89%	$1,77 \times 10^7$
039	D14	09/05/2018	93%	$1,10 \times 10^7$	90%	$1,78 \times 10^7$	88%	$1,57 \times 10^7$
040	D0	07/05/2018	92%	$1,87 \times 10^7$	93%	$3,18 \times 10^7$	92%	$5,75 \times 10^7$
040	D3	10/05/2018	92%	$1,28 \times 10^7$	90%	$3,20 \times 10^7$	93%	$5,12 \times 10^7$
041	D0	08/05/2018	93%	$1,44 \times 10^7$	91%	$2,49 \times 10^7$	90%	$3,88 \times 10^7$
041	D3	11/05/2018	94%	$1,07 \times 10^7$	83%	$6,57 \times 10^6$	81%	$4,57 \times 10^6$
042	D0	04/06/2018	86%	$3,40 \times 10^6$	89%	$7,86 \times 10^6$	87%	$7,98 \times 10^6$
042	D3	07/06/2018	89%	$7,98 \times 10^6$	90%	$1,52 \times 10^7$	90%	$2,06 \times 10^6$
043	D0	05/06/2018	92%	$3,38 \times 10^7$	91%	$4,74 \times 10^7$	90%	$2,64 \times 10^7$
044	D0	05/06/2018	92%	$3,61 \times 10^7$	92%	$5,29 \times 10^7$	91%	$1,41 \times 10^8$
044	D3	08/06/2018	93%	$2,86 \times 10^7$	90%	$3,71 \times 10^7$	91%	$3,03 \times 10^7$
045	D0	13/06/2018	91%	$1,11 \times 10^8$	93%	$6,76 \times 10^7$	94%	$5,71 \times 10^7$
045	D3	16/06/2018	93%	$3,0 \times 10^7$	91%	$4,91 \times 10^7$	92%	$5,56 \times 10^7$
045	D7	20/06/2018	90%	$1,9 \times 10^8$	89%	$8,22 \times 10^7$	93%	$3,0 \times 10^7$
046	D0	13/06/2018	89%	$5,67 \times 10^6$	0%	0	88%	$1,08 \times 10^7$
046	D3	16/06/2018	91%	$2,21 \times 10^7$	90%	$1,73 \times 10^7$	89%	$2,18 \times 10^7$
047	D0	03/07/2018	97%	$8,15 \times 10^6$	90%	$7,27 \times 10^6$	96%	$6,74 \times 10^7$
047	D3	06/07/2018	98%	$4,67 \times 10^6$	90%	$4,81 \times 10^6$	83%	$1,04 \times 10^6$
047	D7	10/07/2018	95%	$8,21 \times 10^6$	93%	$9,27 \times 10^6$	91%	$1,79 \times 10^6$
048	D0	03/07/2018	93%	$2,38 \times 10^7$	93%	$4,66 \times 10^7$	96%	$6,47 \times 10^7$
048	D3	06/07/2018	96%	$2,00 \times 10^7$	94%	$2,26 \times 10^7$	96%	$3,79 \times 10^7$
049	D0	04/07/2018	96%	$2,61 \times 10^7$	95%	$3,65 \times 10^7$	96%	$2,67 \times 10^7$
049	D3	07/07/2018	90%	$1,42 \times 10^7$	96%	$1,51 \times 10^7$	96%	$2,11 \times 10^7$
050	D0	04/07/2018	95%	$1,57 \times 10^7$	90%	$1,27 \times 10^6$	88%	$1,11 \times 10^6$
050	D3	07/07/2018	95%	$1,78 \times 10^8$	93%	$1,44 \times 10^7$	95%	$2,25 \times 10^7$
050	D7	11/07/2018	94%	$1,11 \times 10^7$	93%	$1,13 \times 10^7$	96%	$2,92 \times 10^7$
051	D0	04/07/2018	92%	$2,22 \times 10^6$	96%	$2,99 \times 10^7$	89%	$1,75 \times 10^7$
051	D3	07/07/2018	95%	$1,82 \times 10^7$	94%	$1,39 \times 10^7$	91%	$1,03 \times 10^7$
051	D7	11/07/2018	93%	$1,84 \times 10^8$	95%	$1,48 \times 10^7$	96%	$3,01 \times 10^7$
052	D0	01/08/2018	95%	$1,24 \times 10^7$	90%	$3,81 \times 10^7$	93%	$4,35 \times 10^7$

continua...

...continuação

053	D0	03/08/2018	94%	$1,57 \times 10^7$	94%	$2,14 \times 10^7$	94%	$2,78 \times 10^7$
053	D3	06/08/2018	89%	$1,58 \times 10^5$	0%	0	88%	$8,03 \times 10^5$
054	D0	07/08/2018	92%	$6,34 \times 10^6$	90%	$5,57 \times 10^6$	94%	$3,03 \times 10^7$
054	D3	10/08/2018	89%	$9,21 \times 10^6$	92%	$5,40 \times 10^6$	94%	$2,66 \times 10^7$
055	D0	07/08/2018	96%	$2,63 \times 10^6$	95%	$2,24 \times 10^7$	89%	$4,65 \times 10^7$
055	D3	10/08/2018	97%	$1,46 \times 10^7$	93%	$8,15 \times 10^6$	97%	$3,15 \times 10^7$
056	D0	10/08/2018	90%	$3,75 \times 10^6$	88%	$9,33 \times 10^6$	93%	$6,42 \times 10^7$
056	D3	13/08/2018	90%	$1,25 \times 10^7$	88%	$9,27 \times 10^6$	93%	$3,47 \times 10^7$
056	D7	17/08/2018	94%	$1,15 \times 10^7$	93%	$8,39 \times 10^6$	96%	$2,32 \times 10^7$
057	D0	13/08/2018	95%	$1,80 \times 10^7$	89%	$1,07 \times 10^7$	91%	$3,71 \times 10^7$
058	D0	13/08/2018	92%	$9,27 \times 10^6$	88%	$9,56 \times 10^6$	89%	$5,69 \times 10^6$
058	D3	16/08/2018	93%	$7,04 \times 10^6$	91%	$6,10 \times 10^6$	89%	$6,22 \times 10^6$
059	D0	14/08/2018	91%	$1,44 \times 10^7$	94%	$1,69 \times 10^7$	85%	$6,80 \times 10^6$
059	D3	17/08/2018	94%	$1,59 \times 10^7$	94%	$1,85 \times 10^7$	85%	$4,99 \times 10^6$
060	D0	14/08/2018	94%	$5,23 \times 10^7$	96%	$5,55 \times 10^7$	96%	$5,55 \times 10^7$
060	D3	16/08/2018	94%	$2,16 \times 10^7$	94%	$1,04 \times 10^8$	93%	$4,09 \times 10^7$
060	D7	20/08/2018	89%	$1,94 \times 10^7$	87%	$3,11 \times 10^6$	86%	$1,13 \times 10^7$
061	D0	14/08/2018	89%	$1,28 \times 10^7$	93%	$1,4 \times 10^7$	88%	$7,16 \times 10^6$
061	D3	16/08/2018	90%	$1,31 \times 10^7$	95%	$1,46 \times 10^7$	95%	$8,62 \times 10^6$
061	D7	20/08/2018	90%	$4,99 \times 10^6$	90%	$8,86 \times 10^6$	87%	$2,82 \times 10^6$
062	D0	27/08/2018	96%	$4,34 \times 10^6$	92%	$2,01 \times 10^7$	87%	$9,97 \times 10^6$
062	D3	30/08/2018	93%	$1,35 \times 10^7$	94%	$1,11 \times 10^7$	85%	$3,35 \times 10^6$
063	D3	01/09/2018	94%	$1,54 \times 10^7$	95%	$3,55 \times 10^7$	93%	$4,24 \times 10^7$
063	D7	05/09/2018	96%	$4,92 \times 10^7$	84%	$4,76 \times 10^7$	94%	$2,93 \times 10^7$
063	D0	29/0/2018	91%	$2,09 \times 10^7$	0%	0	95%	$1,01 \times 10^7$
064	D0	03/09/2018	90%	$2,12 \times 10^7$	93%	$3,31 \times 10^7$	90%	$2,41 \times 10^6$
065	D0	03/09/2018	89%	$1,73 \times 10^7$	95%	$2,48 \times 10^7$	88%	$4,99 \times 10^6$
065	D3	06/09/2018	91%	$9,50 \times 10^6$	94%	$1,34 \times 10^7$	94%	$1,70 \times 10^7$
066	D0	10/09/2018	90%	$3,64 \times 10^6$	95%	$4,67 \times 10^7$	91%	$1,06 \times 10^7$
066	D3	13/09/2018	92%	$2,20 \times 10^7$	89%	$4,69 \times 10^7$	92%	$7,02 \times 10^6$
067	D0	14/09/2018	92%	$1,41 \times 10^7$	94%	$2,86 \times 10^7$	85%	$4,75 \times 10^7$
068	D0	17/09/2018	91%	$7,39 \times 10^6$	93%	$3,01 \times 10^7$	94%	$6,81 \times 10^7$
068	D3	20/09/2018	90%	$9,91 \times 10^6$	94%	$2,67 \times 10^7$	92%	$4,11 \times 10^7$
069	D0	18/09/2018	92%	$1,48 \times 10^7$	93%	$3,53 \times 10^6$	89%	$7,45 \times 10^6$
070	D0	18/09/2018	91%	$1,4 \times 10^7$	97%	$2,35 \times 10^7$	86%	$1,73 \times 10^7$
070	D7	25/09/2018	94%	$1,33 \times 10^7$	93%	$2,05 \times 10^7$	87%	$4,75 \times 10^6$
071	D0	24/09/2018	92%	$1,74 \times 10^7$	93%	$5,18 \times 10^7$	93%	$5,18 \times 10^7$
071	D3	27/09/2018	90%	$1,98 \times 10^7$	93%	$2,92 \times 10^7$	92%	$3,43 \times 10^7$
071	D7	01/10/2018	90%	$1,27 \times 10^7$	94%	$2,40 \times 10^7$	87%	$4,05 \times 10^6$
072	D0	24/09/2018	91%	$1,89 \times 10^7$	89%	$5,88 \times 10^7$	97%	$7,35 \times 10^7$
072	D3	27/09/2018	93%	$4,07 \times 10^6$	90%	$4,42 \times 10^7$	88%	$2,42 \times 10^7$
072	D7	01/10/2018	89%	$3,34 \times 10^6$	92%	$1,12 \times 10^7$	94%	$1,45 \times 10^7$
073	D0	25/09/2018	92%	$1,50 \times 10^7$	92%	$4,77 \times 10^7$	95%	$4,77 \times 10^7$

D0	D3	D7	D14
----	----	----	-----

Apêndice 2. Figuras suplementares de citometria de fluxo, expressão de citocinas e expressão gênica

Figura suplementar 1. Definição de *gates* de exclusão de debris (SSC-A versus FSC-A) e *doublets* (SSC-H versus SSC-A ou FSC-H versus FSC-A) das diferentes subpopulações, através de citometria de fluxo. As amostras de *buffy coat* (A), PBMC (B) e granulócitos (C) utilizadas foram a AT#17 (descongeladas) e AT#20 (a fresco)

Figura suplementar 2. Amostras de plasma foram obtidas de coletas de sangue periférico dos grupos: controle UTI, sepse e choque séptico e analisadas as citocinas usando um kit de Ensaio de Luminex. Cada ponto demonstrado no gráfico representa um indivíduo e os dados foram representados em mediana e intervalo interquartil, aplicado o teste de Krsukal-Wallis e encontramos alterações significativas nas citocinas: IL-12p70 e IL-13. Valores-p entre controles saudáveis, controles UTI e pacientes com sepse no dia 0 são mostrados: * p<0,05 e ** p<0,01

Figura suplementar 3. Amostras de plasma foram obtidas de coletas de sangue periférico dos grupos: controle UTI, sepse e choque séptico e analisadas as citocinas usando um kit de Ensaio de Luminex. Cada ponto demonstrado no gráfico representa um indivíduo e os dados foram representados em mediana e intervalo interquartil, aplicado o teste de Krsukal-Wallis e encontramos alterações significativas nas citocinas: IL-17A, GM-CSF e MCP-1. Valores-p entre controles saudáveis, controles UTI, pacientes com sepse e pacientes com choque séptico no dia 0 são mostrados: * p < 0,05 e ** p<0,01

Figura suplementar 4. Amostras de plasma foram obtidas de coletas de sangue periférico dos grupos: controle UTI, sepse e choque séptico e analisadas as citocinas usando um kit de Ensaio de Luminex. Cada ponto demonstrado no gráfico representa um indivíduo e os dados foram representados em mediana e intervalo interquartil, aplicado o teste de Krsukal-Wallis e não encontramos alterações significativas nas citocinas no dia 0

Figura suplementar 5. Amostras de plasma foram obtidas de coletas de sangue periférico dos grupos: controle UTI, sepse e choque séptico e analisadas as citocinas usando um kit de Ensaio de Luminex. Cada ponto demonstrado no gráfico representa um indivíduo e os dados foram representados em mediana e intervalo interquartil, aplicado o teste de Kruskal-Wallis e não encontramos alterações significativas nas citocinas no dia 3

Figura suplementar 6. Amostras de plasma foram obtidas de coletas de sangue periférico dos grupos: controle UTI, sepse e choque séptico e analisadas as citocinas usando um kit de Ensaio de Luminex. Cada ponto demonstrado no gráfico representa um indivíduo e os dados foram representados em mediana e intervalo interquartil, aplicado o teste de Krsukal-Wallis e não encontramos alterações significativas nas citocinas no dia 3

Figura suplementar 7. Amostras de plasma foram obtidas de coletas de sangue periférico dos grupos: controle UTI, sepse e choque séptico e analisadas as citocinas usando um kit de Ensaio de Luminex. Cada ponto demonstrado no gráfico representa um indivíduo e os dados foram representados em mediana e intervalo interquartil, aplicado o teste de Krsukal-Wallis e não encontramos alterações significativas nas citocinas no dia 3

Análise do dia 3 da expressão gênica de RIPK3 (A) e expressão gênica de MLKL (B) comparando os grupos os grupos controle UTI, sepse e choque séptico. A expressão dos genes de interesse foi normalizada pela média geométrica da expressão dos genes de referência GAPDH e β -actina, também quantificados por qPCR. Não encontramos alterações significativas quando os grupos foram comparados.

Figura suplementar 8. Análise da expressão gênica por qPCR de RIPK3 e MLKL dos grupos experimentais no dia 3