

ERNALDO BOSCO AVALOS CAJINA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
UNICAMP

QUIMIOTAXIA DE POLIMORFONUCLEARES EM
CRIANÇAS GRAVEMENTE ENFERMAS

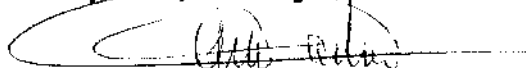
DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS PARA A OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS, NA ÁREA DE FARMACOLOGIA

ORIENTADOR: PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

UNICAMP
1996

**Este exemplar corresponde à versão final da
tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de
Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção
do título de Mestre em Ciências, na Área de
Farmacologia do Médico Ernaldo Bosco Avalos
Cajina**

Campinas, 25 de julho de 1996



**Prof. Dr. Gilberto de Nucci
- Orientador -**

C124q

28569/BC

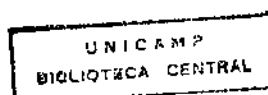
**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

C124q Cajina, Ernaldo Bosco Avalos
Quimiotaxia de polimorfonucleares em crianças gravemente
enfermas. / Ernaldo Bosco Avalos Cajina. Campinas, SP :[S.N.],
1996.

Orientador: Gilberto de Nucci

Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Quimiotaxia. 2. Leucócitos. 3. Crianças graves. I. Gilberto
de Nucci. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.



Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto de Vucci

Membros:

1. Prof. Dr. Gilberto de Vucci

2. Prof. Dr. Fernando de Azevedo Cunha

3. Prof. Dr. Manoel Luiz dos Santos Uchida

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data:

25/07/96

Dedicatória

A minha mãe, Stella e recordado pai, Ernaldo

A minha esposa Cláudia e ao meu filho,

Daniel

Agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, por sua magnitude como Orientador desta tese.

Ao Prof. Dr. Antonio Condino-Neto, pelo seu esmero e dedicação como multiplicador de conhecimentos.

À Profa. Paulina Sannomiya, que sempre esteve ao alcance para me proporcionar diversas diretrizes referentes à metodologia científica.

Ao Prof. Carlos Alberto Flores, por sua inmensurável percepção, desde o início acreditando firmemente no produto final deste trabalho.

Ao Dr. Carlos Lopes e Equipe de Enfermagem da Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica da UNICAMP, pelo auxílio técnico.

Aos Profs. Marinho Gomes de Andrade Filho e Aquiles E. Piedra Buena, pelo empenho, dinamismo e valiosa contribuição na análise estatística dos resultados.

Ao Dr. Cláudio Lucio Rossi e a bióloga Andréia Teodoro da Silva, que com prontidão e sem medir esforços, facilitaram a execução das dosagens de frações do Complemento sérico.

Ao Dr. Gilberto Assunção Fernandes e a bióloga Laurione Cândido de Oliveira, responsáveis pela execução das dosagens de Cortisol sérico.

Ao prof. Stephen Hyslop pelas sugestões e revisão completa do *Summary*.

A bióloga Heloisa Helena de Araujo Ferreira pelo treinamento e orientação nas técnicas de isolamento de polimorfonucleares *in vitro*.

Ao biólogo Ronilson Agnaldo Moreno que habilmente providenciou a obtenção gratuita de um kit para a dosagem sérica de cortisol, frente aos distribuidores no Brasil.

Aos Auxiliares do Laboratório de coletas do Hospital das Clínicas da UNICAMP e da Unidade Básica de Saúde -Vila Real- em Hortolândia, colaboradores na retirada de amostras de sangue de doadores.

A todos os pacientes e doadores que participaram deste estudo.

ABREVIATURAS USADAS NESTA TESE

"A"	Protocolo "A" de quimiotaxia
AINE	Anti-inflamatórios não esteróides
"B"	Protocolo B"
C/C	Número de células por campo visual(unidade de quimiotaxia)
C3c	Fração C3c do complemento
C4	Fração C4 do complemento
EPM	Erro padrão da média
f-MLP	Formil-metionil-leucil-fenilalanina
G1	Indicador de assimetria
G2	Indicador de curtosis
IL	Interleucina
IQc	Índice de quimiotaxia de controles
IQp	Índice de quimiotaxia de pacientes
LPS	Lipopolissacáride de E. coli
ME	Migração espontânea
MNEM	Meio mínimo essencial de Eagle
NS	Não significativo
p	Valor p
P	Percentis
PMNs	Polimorfonucleares
PO	Pós-operatório
SA	Soro ativado com LPS de E. coli
SC	Soro de controles
SNA	Soro não ativado
SP	Soro de pacientes

ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO	1
II.	OBJETIVOS	15
III.	CASUÍSTICA E MÉTODOS	16
	1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	
	1.1. Pacientes	16
	1.2. Critérios de exclusão	16
	1.3. Seleção de doadores	18
	2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	
	2.1. Protocolos clínicos	18
	2.2. Protocolo "A"	19
	-Solução tampão	20
	-Contagem de polimorfonucleares	21
	-Ativação de soros com LPS	22
	-Câmara de quimiotaxia	23
	2.3. Protocolo "Piloto"	27
	2.4. Protocolo "B"	29

3. PROCEDIMENTO LABORATORIAL

3.1. Dosagem de cortisol	31
3.2. Frações do complemento	31
-Fração C3c	32
-Fração C4	33

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
------------------------	----

I. INTRODUÇÃO

A heterogeneidade de enfermidades no interior de uma Unidade de Terapia Intensiva continua sendo um dos grandes desafios no dia a dia do profissional envolvido nessa área. Vários autores têm se preocupado em caracterizar os riscos de mortalidade de pacientes dessas unidades, na tentativa de se obterem dados, que permitam efetuar um prognóstico baseado nas condições clínicas do doente e até determinar numericamente a probabilidade de sua sobrevivência (POLLACK *et al.*, 1984a; KNAUS *et al.*, 1984; POLLACK *et al.*, 1984b).

Nenhum parâmetro, entretanto, foi sensível o suficiente para influenciar a terapêutica sobre um único paciente devido à falta de especificidade. Os "scores" existentes medem o desvio do normal de certos parâmetros clínicos laboratoriais fisiológicos, previamente selecionados que correlacionam a perda da homeostasia com a severidade da doença. Muitas vezes os pacientes com prognóstico desfavorável sobrevivem e, os de prognóstico mais favorável evoluem para óbito. Isto ocorre porque esses óbitos inesperados não estão diretamente relacionados com a doença no momento da internação e sim com complicações posteriores.

O interesse no estudo e aplicação de índices prognósticos vem ganhando espaço no Brasil, devido às restrições econômicas e sociais, exigindo um controle sobre a eficácia das unidades de terapia intensiva, com um melhor entendimento da qualidade e oportunidade da assistência médica (ROCCO & DAVID, 1993).

Grandes avanços na terapêutica e abordagem da criança gravemente enferma têm ocorrido nas últimas décadas, reduzindo os níveis de mortalidade, seqüelas e tempo de permanência hospitalar, possibilitando a reintegração mais rápida dos pacientes à sociedade.

Paralelamente a esses avanços, existem hoje grandes centros especializados pelo mundo inteiro, treinando, a cada dia, mais profissionais dispostos a se aprofundar no ramo, o que acelerou muito o número de unidades de cuidados intensivos nas diversas especialidades. Esta prática acabou se refletindo positivamente, trazendo contribuições à literatura com uma visão que aborda um outro ângulo na pesquisa científica. Igualmente, tenta-se dar respostas àquilo que, a princípio, não se conhece em sua totalidade e, até com certa frequência, levantam-se hipóteses oriundas, na maioria das vezes, de experiências *in vitro* ou *in vivo*, realizadas em animais.

Quimiotaxia é um processo no qual as células fagocitárias são atraídas para o local da inflamação. O termo foi usado, pela primeira vez, por Leber (1888) e, posteriormente, por Comandon (1917) que utilizou recursos de cinematografia existentes à época ("time-lapse") para demonstrar o fenômeno.

Anos depois, em 1938, a conhecida "leucotaxina", uma substância endógena que reproduzia vários aspectos do processo inflamatório observados durante a lesão tecidual, foi isolada e caracterizada por Menkin (1938), que resultou ser o próprio sistema complemento, o responsável por alguns tipos de migração leucocitária e que também aumentava a permeabilidade capilar, como constatou Delaunay *et al.* (1951), Miles e Wilhelm (1955 e 1958) e Spector (1957).

Entre 1925 e 1940, os Clarks foram os primeiros a observar que os polimorfonucleares neutrófilos atravessavam a parede dos vasos com maior velocidade do que outros tipos de leucócitos, cujo processo durava de 2 a 8 minutos. Naquela ocasião puderam concluir que era necessária uma alteração do próprio endotélio antes de ocorrer a migração.

Ainda nessa época, vários investigadores, de forma independente, observaram que a depleção de neutrófilos em animais aumentava a frequência de lesões a nível de pequenos vasos por reações do tipo imune, como a reação local de Arthus, a doença do soro, a nefrite nefrotóxica e a artrite (Stetson, 1951; Humphrey, 1955; Page e Good, 1958; Movat *et al.*, 1963; De Shazo *et al.*, 1972).

Mais recentemente, Showell e Williams (1989), demonstraram que a presença dos neutrófilos era necessária para haver aumento da permeabilidade capilar (edema tissular) e lesão. Esse estudo foi realizado em animais, utilizando modelos de alergia aguda e de inflamação não alérgica.

Nos mamíferos, os polimorfonucleares neutrófilos são as células efetoras primárias que participam na resposta inflamatória. A medula óssea produz em torno de 80 milhões de neutrófilos por minuto. Têm meia vida relativamente curta, de 2 a 3 dias, se comparados com macrófagos, que podem viver por vários meses e até anos. Representam cerca de 60-70% do total de leucócitos circulantes no sangue, porém, são também encontrados nos leitos extravasculares (ROITT, *et al.*, 1989).

Como o próprio nome sugere, as formas maduras de polimorfonucleares, geralmente possuem um núcleo multilobulado e contêm vários tipos de grânulos. São classificados em neutrófilos, eosinófilos e basófilos, com base em técnicas histológicas de coloração de seus grânulos.

Neste trabalho, a atenção está voltada preferencialmente aos polimorfonucleares neutrófilos. Eles, medindo entre 10-20 μm de diâmetro, representam cerca de 90% das formas circulantes. Possuem dois tipos principais de grânulos. Os grânulos primários (azurofílicos) contêm hidrolases ácidas, mieloperoxidase e muramidase(lisozima); os grânulos secundários ou específicos, além de lisozima, são ricos em lactoferrina. Estes dois tipos de grânulos têm importante participação, acoplados ao processo de fagocitose que ocorre no interior da célula (ROITT, et al., 1989; CALICH & VAZ., 1989).

SKALAK *et al.*(1984) verificou *in vitro*, que os polimorfonucleares neutrófilos são dotados de propriedades viscoelásticas que permitem a sua deformação e locomoção. Em soluções isotônicas ou no interior de arteríolas e vênulas, apresentam-se geralmente esféricos, deformando-se ao passar pela rede capilar da microcirculação. Locomovendo-se sobre um substrato, a sua porção anterior se distende, na forma de um véu hialino (lamelipódio) e a porção posterior adquire a conformação de uma cauda (uropódio). Entretanto, células em suspensão podem, também, exibir formação de pseudópodes, indicando que a energia e forças necessárias à sua deformação são de origem interna e não dependem de propriedades exclusivas da célula.

Em condições normais, os neutrófilos presentes na circulação sob a forma não ativada (sem *priming*), ocasionalmente interagem de forma irreversível, com as células endoteliais. Durante o processo inflamatório esta situação se reverte dramaticamente quando grande número de neutrófilos começam a aderir ao longo da parede endotelial com movimentos rotatórios no local lesado. Posteriormente, migram através da parede do vaso em busca de material estranho para iniciar a fagocitose, acoplada a um processo de lise enzimática e formação de metabólitos reativos do oxigênio (RAMPART, 1994).

Vários tipos de moléculas de adesão, localizadas na superfície de células endoteliais e de neutrófilos, parecem estar envolvidas no processo inflamatório. Assim que este se inicia, as selectinas endoteliais se tornam presentes, provavelmente, devido a sua alta afinidade por resíduos de ácido siálico contidos na superfície dos neutrófilos (PHILLIPS, *et al.*, 1990). Este mecanismo requer a presença do GMP-140 e da molécula de adesão do leucócito, localizada na célula endotelial (ELAM-1). Esta última é responsável pela adesividade inicial, decorrente da própria lesão, e da ação de endotoxinas ou de citocinas solúveis, podendo durar de 10 minutos a 4 horas (MANTOVANI, *et al.*, 1992).

Um segundo mecanismo de adesão, combina a ação das integrinas (glicoproteínas localizadas na superfície dos neutrófilos), com as moléculas de adesão intracelulares contidas nas células endoteliais (ICAM-1). A integração dessas duas famílias é vital para que o neutrófilo possa migrar normalmente (TODD & FREYER., 1988).

Durante décadas, diversos trabalhos foram publicados utilizando ensaios indiretos para determinar a quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares *in vitro*. A câmara de Boyden, permitindo ensaios indiretos, foi uma ferramenta de grande utilidade para determinar o potencial quimiotático de várias substâncias (HADDOX & PFISTER, 1993). Hoje estão disponíveis comercialmente, diversos modelos modificados da câmara de Boyden. Alguns críticos recomendam que este tipo de câmara deva ser utilizado como método inicial de “screening”, para avaliar a quimiotaxia de grandes amostras, porque não é capaz de discriminar com precisão, quimiotaxia de quimiocinese. Ensaios posteriores, porém, do tipo direto, seriam mandatórios para complementar qualquer investigação.

Estímulos quimiotáticos clássicos como a n-formyl-metionil-leucyl-fenilalanina (fMLP), zimosan, fator de agregação plaquetária (PAF), interferon, interleucinas (IL-8), lipopolissacáride de *E. coli* (LPS) e outros, têm sido longamente usados para induzir a migração de polimorfonucleares com metodologias diversas, tanto em humanos como em animais, *in vitro* ou *in vivo*.

SUGAWARA *et al.* (1995), comparam a locomoção *in vitro* de neutrófilos humanos com os de vários animais, que sendo expostos aos mesmos agentes quimiotáticos, demonstram significativamente, a superioridade da espécie humana. Entretanto, foram publicados outros trabalhos, avaliando a inibição da quimiotaxia, como acontece com a toxina da *B. pertussis*, que se liga à proteína G, acoplada ao receptor. Ela é capaz de inibir a resposta a agentes quimiotáticos clássicos, ao ser pré-incubada com os neutrófilos (THELEN *et al.*, 1995). Inibição medicamentosa por anti-inflamatórios não esteróides (AINES) de amplo uso em crianças, como o ácido acetil-salicílico, o tenoxicam, piroxicam

e o diclofenaco de sódio são inibidores dose-dependente da quimiotaxia (HASÇELIK *et al.*, 1994).

Com o sucesso na amplificação da inflamação, observado com extratos de polissacáride de *E. coli*, retirado de bactérias gram-negativas, pode ser conhecida mais detalhadamente a estrutura desta substância (**Fig. 1a e 1b**).

Foi confirmada a existência de um antígeno -o Antígeno "O"- que consiste em uma cadeia lateral de polissacáride, o qual, por sua vez, liga-se a um fosfolípide contendo glicosamina -o Lipídio "A"- através do polissacáride "core". A variabilidade antigênica entre os diversos lipopolissacárides isolados de diferentes cepas, deve-se primariamente, a diferenças no antígeno "O", já que o componente lipídico "A" permanece inalterado do ponto de vista antigênico (GIROIR, 1993; RAETZ, 1990; RAETZ *et al.*, 1991).

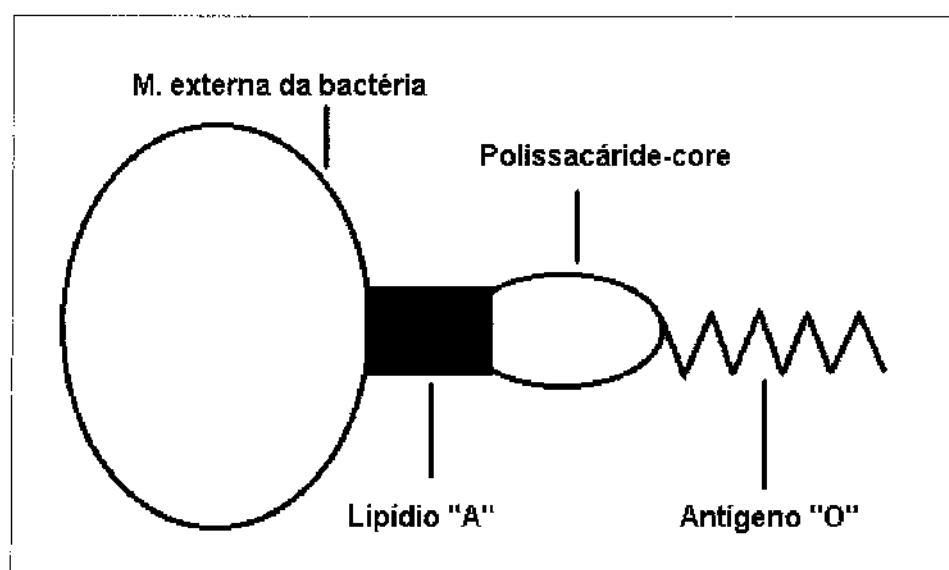


Fig. 1a O diagrama ilustra a estrutura do lipopolissacarídeo de E.coli , composta de uma cadeia lateral, o antígeno-O ligada a um fosfolípide contendo glicosamina (lipídio-A) através de uma ponte, o polissacarídeo "core".

(Crit Care Med 1993; 21:780-789)

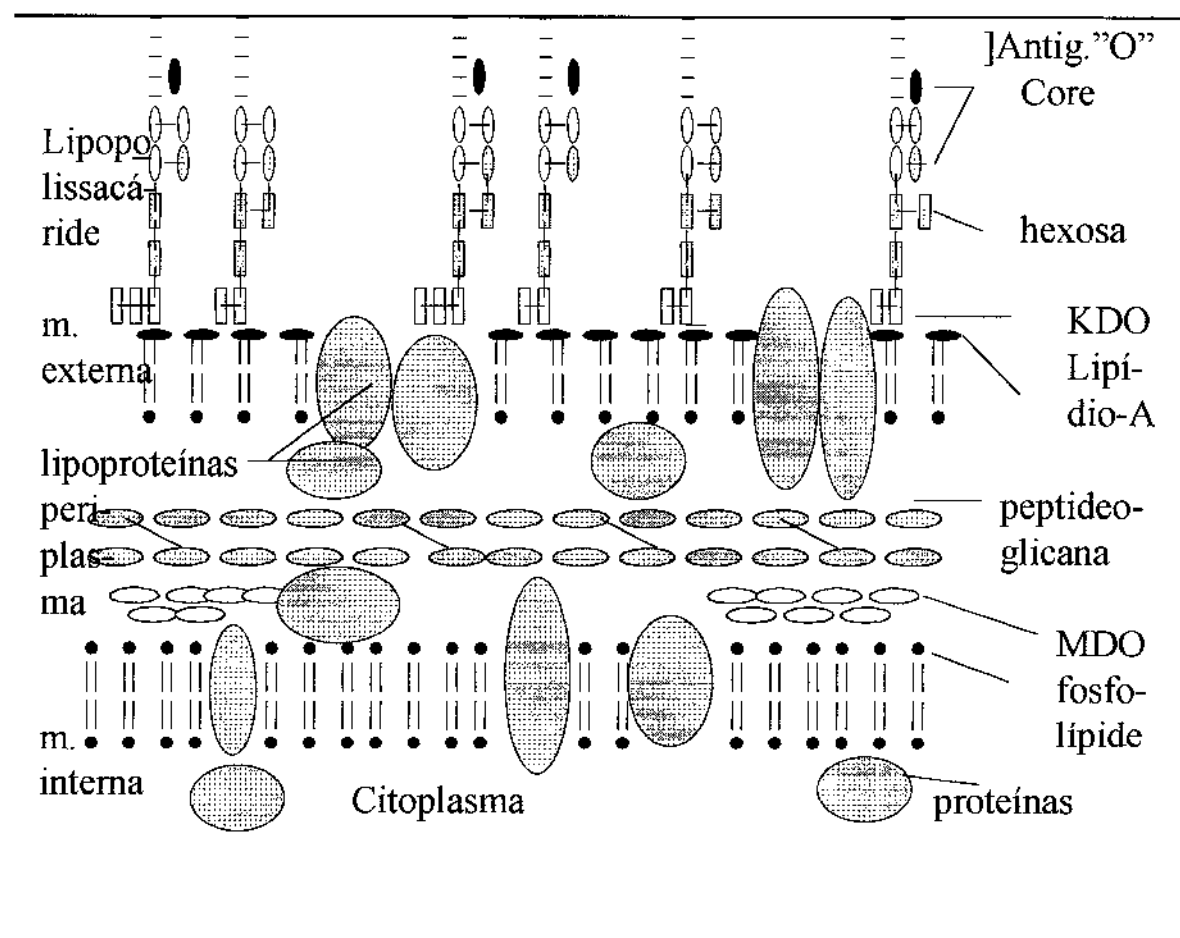


Fig. 1b Observa-se em detalhes a localização dos lipídios e proteínas no envelope da *E. coli*. As pequenas estruturas retangulares e ovais localizadas no terço superior ilustram os resíduos de açúcares (hexosa). Os círculos pretos cheios, representam as cabeças dos grupos polares dos fosfolípidos. MDO, são oligossacarídeos derivados da membrana, e, o KDO, é o ácido 3-desoxi-D-manno-octulosônico. O KDO e a hexosa representam o *core* interno do LPS. (*FASEB J.*, 5: 2653, 1991).

A existência de receptores específicos de LPS, nível de membrana celular em mamíferos, ficou bem documentada, inicialmente em murinos (em esplenócitos isolados). Nestes, o primeiro receptor de membrana e de natureza protéica descoberto até esse momento, era de 80-kDa com capacidade para reconhecer o lipídio A da molécula de LPS, também presente em linfócitos T e B e macrófagos, porém, ausente em hemácias humanas.

Um segundo receptor, com peso molecular de 95-kDa, foi posteriormente descrito por Golenbock *et al.*(1990), e isolado em fagócitos humanos, sem lhe atribuir funções biológicas associadas com a ligação ao LPS. Provavelmente tenha alguma ação como receptor *scavenger* em macrófagos, podendo facilitar o *clearance* e a detoxificação do LPS, já que a recaptação e o metabolismo de derivados do LPS, executada por macrófagos, foi bloqueada quando lipoproteínas acetiladas de baixa densidade ocupavam esses receptores.

Também se comprovou a presença de uma proteína sérica ligadora de LPS, de 60-kDa, sintetizada no fígado e presente em baixas concentrações plasmáticas em condições normais, tendente a elevar-se na vigência de um processo inflamatório agudo, com capacidade de reconhecer a região do lipídio A na molécula de LPS (HEWETT & ROTH, 1993). Essa proteína, denominada LBP, é capaz de aumentar a fagocitose de bactérias gram-negativas. Provavelmente, funciona como uma opsonina, que ligando-se ao LPS na superfície da bactéria, permite o reconhecimento do mesmo por células fagocitárias (WRIGHT *et al.*, 1989).

A interação do LPS com os fagócitos *in vitro*, depende da presença do CD18, receptor de natureza protéica, que pertence à família das integrinas (WRIGHT & JONG, 1986). Macrófagos e polimorfonucleares possuem o receptor CD18 na sua superfície, o qual, em associação com um subtipo de receptor CD11, são capazes de mediar uma série de funções. Dentre elas, a aderência de células a superfícies e fagocitose de partículas (opsonizadas), com fatores derivados do complemento ou com anticorpos (WRIGHT & DETMERS, 1988).

A interação do LPS com o receptor CD18, ocorre de forma independente, não precisando de opsonização prévia por fatores derivados do complemento ou por anticorpos, e parece ser relevante na fagocitose de bactérias gram-negativas pelos fagócitos.

O processo inflamatório agudo, visto em nível de microcirculação, no qual a célula endotelial é o seu órgão alvo, mantém uma integração direta e acoplada com o neutrófilo; ambos constituem o mecanismo básico da inflamação. A maior preocupação tem sido a forma de bloquear a reação inflamatória uma vez iniciada ou, então, ao menos atenuar, de alguma maneira, o processo, tentando poupar, ao máximo, a célula alvo.

A marginação (*rolling*) de leucócitos *in vivo*, pode ser rapidamente induzida em vênulas pós-capilares, após o comprometimento do endotélio por um estímulo inflamatório. Moléculas de adesão localizadas na superfície da célula endotelial, garantem a seqüência desse processo. Dentre elas, a família das selectinas (P-, L-, e E-selectina), tem uma participação relevante. As selectinas P e E, se expressam na superfície de células endoteliais ativadas, e

se ligam a receptores localizados nos neutrófilos. A L-selectina, se expressa exclusivamente nos neutrófilos e se liga firmemente ao endotélio. Com base nessas descobertas e na precocidade em que ocorre a marginação no processo inflamatório, é que se propôs inibir a ação das selectinas através de anticorpos monoclonais do tipo IgG. No estudo realizado por NORMAN, K.E. *et al.* (1995) *in vivo* em ratos, verificou-se que houve redução significativa da diapedese em vênulas de mesentério, naqueles animais cujos neutrófilos tinham sido incubados com anticorpos monoclonais específicos, anti-P-selectinas do tipo 1. Este tipo de ensaios, certamente contribuirá com as informações já existentes, na elucidação dos mecanismos de adesão endotélio-neutrófilo no local da inflamação.

A diversidade de mediadores existentes e seus precursores de natureza protéica, sua integração com alguns receptores não completamente estudados e o isolamento de certos antagonistas endógenos, parecem ter apontado com maior precisão o rumo das investigações. Entretanto, doenças mais recentes como a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (ACCP, 1992), relativamente frequente nos pacientes críticos e que se refere ao mesmo quadro clínico e fisiopatológico visto na sepsis, porém sem confirmação diagnóstica laboratorial, espera por maiores descobertas que possam modificar, de alguma forma, as taxas de sobrevida.

Certas doenças inflamatórias, como a glomerulonefrite e a artrite reumatóide, têm sido úteis ao se estudar o processo inflamatório, possibilitando analisar o fenômeno de forma amplificada, verificando não somente o acúmulo de neutrófilos no local da lesão, mas também a participação de mediadores liberados pelos tecidos, enzimas lisossômicas, ânions superóxidos e radicais

livres, entre outros, que podem potencializar as lesões nos tecidos vizinhos (MALLECH & GALLIN, 1987; LEHRER *et al.*, 1988; HESTON & JOHNSTON, 1987; WEISS, 1989).

No vasto contexto da inflamação, a migração de polimorfonucleares neutrófilos tem sido analisada detalhadamente sob vários aspectos, dentre eles a função microbicida, a locomoção, a adesividade (comprometida na síndrome da deficiência de adesividade leucocitária), a morfologia (com ênfase nos receptores nível de membrana), a bioquímica dos componentes intracelulares tais como a produção de mieloperoxidase, defeitos granulares, e sua interação com outras células.

É totalmente inviável pensar em quimiotaxia de polimorfonucleares como um evento isolado. A interação de outras células que participam do processo inflamatório foi confirmada; é o caso de macrófagos residentes, que quando depletados inibem o recrutamento de neutrófilos ao local da lesão, fato bem documentado nos trabalhos de SOUZA *et al.* (1988) e KLEIN *et al.* (1995). Este último, avaliou em ratos imunizados tratados com dexametasona, a participação de linfócitos na migração de polimorfonucleares, induzida por ovalbumina, verificando que nos animais tratados não se observou o acúmulo de neutrófilos no tecido lesado. Isto implica que haja alguma participação específica dos linfócitos, com liberação de algum fator(es) quimiotático(s), diferente dos observados por outras citocinas, que é sensível ao bloqueio pela dexametasona.

Embora a diversidade de doenças numa Unidade de Terapia Intensiva determine abordagens terapêuticas das mais variadas, foi comprovado que o fator *estresse* é um denominador comum em todos os pacientes. Na ausência de *estresse*, o organismo mantém um equilíbrio dinâmico, conhecido como homeostase resultante de forças internas e externas complexas; quando o equilíbrio é ameaçado ou perdido, respostas de tipo molecular, celular, fisiológicas e comportamentais são ativadas na tentativa de restabelecer a homeostase. Estas respostas podem ser específicas e localizadas como ocorre com a secreção de insulina quando se eleva a glicemia, ou generalizadas e inespecíficas como a ansiedade severa (MITCHELSON *et al.*, 1994). Parece haver um predomínio de respostas inespecíficas ao se perder o equilíbrio homeostático, que deu lugar a uma síndrome, que STERNBERG *et al.* (1992) denominaram de Síndrome do "Stress" ou de Adaptação geral.

Dada a elevada incidência de infecção nos pacientes internados, adquirida dentro ou fora do hospital, e para melhor avaliar o componente inflamatório decorrente da infecção, optou-se pela utilização do LPS como indutor de migração. Este já demonstrou ser um excelente meio amplificador dos fenômenos observados *in vivo*.

O presente estudo analisa *in vitro* a quimiotaxia de polimorfonucleares de crianças em estado crítico, submetidos a um estímulo quimiotático e determina a influência do soro dessas crianças na quimiotaxia de polimorfonucleares de indivíduos sadios (*controles*).

II. OBJETIVOS

OBJETIVOS

GERAIS

- Avaliar a quimiotaxia *in vitro* de polimorfonucleares em crianças com doenças agudas graves, internadas em uma unidade de terapia intensiva pediátrica.

ESPECÍFICOS

Avaliar:

1. A quimiotaxia de polimorfonucleares em crianças com doenças agudas graves, infecciosas e não infecciosas.
2. Se o soro de *pacientes* (crianças) possui propriedades inibitórias da quimiotaxia de polimorfonucleares em doadores sadios.
3. Se há ou não associação das frações C3c e C4 do complemento, do cortisol sérico e da contagem absoluta de leucócitos, de indivíduos sadios e *pacientes*, com a quimiotaxia dos mesmos.

III. CASUÍSTICA E MÉTODOS

1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

1.1. PACIENTES

O presente trabalho foi realizado com crianças gravemente enfermas, admitidas na Unidade de Tratamento Intensivo Pediátrica (UTIP) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, no Hospital de Clínicas (HC-UNICAMP) no período de maio de 1994 a fevereiro de 1995.

A idade das crianças variava entre 1 e 14 anos e estas apresentavam doenças diversas (**Tabela III.1**), predominantemente de caráter inflamatório, infecciosas e não infecciosas, num total de 33 *pacientes* (estudo) e 29 doadores (*controle*).

Todos os *pacientes* foram acompanhados até o momento da alta e/ou óbito dentro da Unidade.

1.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Lactentes menores de 1 ano de idade, *pacientes* em uso diário de corticóides(até 15 dias precedentes à internação), uso de aminofilina (CONDINO NETO, 1990) e tratamento recente com quimioterapia e radioterapia.

Não foi possível determinar se havia *pacientes* fazendo uso de anti-inflamatórios não esteróides (AINE) no momento da internação. Cefazolina, ampicilina, cloranfenicol e amicacina foram usados em 48.5% dos *pacientes*. Os 51,5% restantes, não fizeram uso de antibióticos.

Tabela III.1 RELAÇÃO DAS DOENÇAS APRESENTADAS PELOS PACIENTES QUE PARTICIPARAM DOS ENSAIOS DE QUIMIOTAXIA *IN VITRO*, AO SEREM ADMITIDOS NA UTIP.

CLASSIFICAÇÃO DAS PATOLOGIAS	
NÃO INFECCIOSAS	INFECCIOSAS
Traumatismo cranioencefálico	Sépsis(H. influenzae)
Hemopneumotórax	Sépsis(criptogenética)
Pneumotórax	Sépsis(estaflócoccica)
Fratura de membros	Sépsis(pneumococo)
Sd. do tanque	Sépsis(E. coli)
Trauma abdominal	Leucemia linfóide aguda
Politraumatizados	Hepatite fulminante
Sd. de Pallester-Killian	Coagulopatias
Insuficiência renal crônica	Queimaduras de 3º grau
PO-Cir. cardíaca	Pneumonias virais
PO-Cir. A. Digestivo	Pneumonias bacterianas
PO-Amigdalectomia	Pneumonias de outras etiologias
Neoplasia do SNC	Infecção do trato genito-urinário
Insuficiência cardíaca	Piopneumotórax
Hipertensão intracraniana	Empiema pulmonar
Encefalopatia hipertensiva	Meningite (pneumococo)
Choque hipovolêmico	Insuficiência de múltiplos órgãos
Ch. cardiogênico	Sd. da Reação Inflamatória Sistêmica

Sd= síndrome, PO= pós-operatório, A= aparelho, Cir= cirurgia

1.3. SELEÇÃO DE DOADORES

O grupo de *doadores* utilizado nos ensaios de quimiotaxia, foi integrado por 21 voluntários sadios, usuários do laboratório de coletas do HC-UNICAMP e de uma Unidade Básica de Saúde (V. Real - Hortolândia, SP), de ambos sexos, com idade entre 18 e 45 anos de idade. Não tinham história recente de uso de corticosteróides ou de terem sido submetidos a quimioterapia, radioterapia ou transfusão com derivados do sangue.

O estudo foi realizado com autorização da Coordenação da UTIP e da Supervisão da Unidade Básica de Saúde.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1. PROTOCOLOS CLÍNICOS

Foram utilizados três protocolos clínicos; sendo um *piloto*, constituído por 8 *pacientes* e 8 *controles*, essencial para a implantação das técnicas e da metodologia de trabalho; os dois restantes, denominados **protocolos "A"** e **"B"** constavam de objetivos altamente específicos e até complementares entre si.

2.2. ENSAIO DE QUIMIOTAXIA *IN VITRO*: PROTOCOLO "A"

O protocolo "A" incluiu 18 *pacientes* e 10 *controles*. Cada *paciente* e/ou *controle* foi cadastrado e os dados foram registrados numa ficha de controle individual (Anexo 1). As amostras foram coletadas entre 09:00 e 10:30 h. em toda a população e de imediato processadas. Em ambos os grupos foram coletadas amostras de 15 mL de sangue periférico, dos quais 5 mL contendo heparina, 10 u/mL(Liquemine®, Roche, São Paulo) foram destinados para o isolamento de polimorfonucleares (PMNs) e os restantes 10 mL, foram reservados para dosagem sérica de cortisol e das frações C3c e C4 do complemento.

O método de separação por gradientes foi utilizado para o isolamento dos PMNs (RICHARDS & McCULLOUGH, 1984; McCULLOUGH *et al.*, 1981). Inicialmente, 2.5 mL de Ficoll-Hystopaque 1119 (Sigma Diagnostics, St. Louis, USA) foram colocados em tubo seco, transparente, com agulha estéril de venopunção 25 x 7 mm; a seguir acrescentou-se, lentamente, inclinando as paredes do tubo, o mesmo volume de Ficoll, porém, com densidade 1077 de gravidade específica, sendo possível delimitar com nitidez a sobreposição de colunas líquidas para finalmente, serem adicionados 5 mL de sangue, vagarosamente, impedindo-se a mistura com os gradientes. Os tubos foram perfeitamente fechados e a seguir centrifugados a 500 x g, durante 30 min, a 25°C .

Desprezado o sobrenadante, rico em plasma e a interface que continha a banda de monócitos, os polimorfonucleares neutrófilos foram localizados formando uma banda turva, logo acima da suspensão de hemácias situada no fundo do tubo, sendo facilmente retirados com pipetas graduadas e despejados em tubos secos. A seleção dos tubos obedece principalmente a dois critérios, o diâmetro e a altura, os quais sendo adequados, facilitam a visualização das bandas de células permitindo que estas fiquem mais distantes entre si, simplificando sua retirada com pipetas graduadas (FERRANTE & THONG., 1982).

2.2.1. SOLUÇÃO TAMPÃO

Uma vez isolados os PMNs, o material foi lavado 2 vezes em 5 mL da solução tampão, e após cada lavagem centrifugadas a 500 x g, durante 10 min, a 25°C. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 500 µL do tampão.

A solução tampão utilizada foi preparada da seguinte forma:

Meio mínimo essencial de Eagle(MNEM)	
(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA).....	1.07 g.
HEPES (Sigma Chemical Co.).....	0.85 g.
Bicarbonato de Sódio (Sigma Chemical Co.).....	0.20 g.
Albumina (Sigma Chemical Co.).....	0.10 g.
Água destilada.....	100 mL.

O pH da solução foi ajustado com NaOH em 7,2, a temperatura ambiente. A presença do meio mínimo essencial de Eagle na composição da solução tampão, lhe confere propriedades que a tornam um excelente meio de cultura. A adição de albumina à solução tampão é essencial, porque a maioria dos leucócitos adere firmemente às malhas de filtros que não contem proteína, por tanto não se locomovendo mesmo na presença de agentes quimiotáticos potentes (WILKINSON *et al.*, 1988).

2.2.2. CONTAGEM DE POLIMORFONUCLEARES

A seguir, foi feita a contagem de PMNs na câmara de Neubauer, após a lise de hemácias na solução de Turk*. Para tal fim, foram separados 400 µL da solução de Turk* em tubo de ensaio limpo e acrescentados 20 µL da suspensão de células.

Solução de Turk*:

Ácido acético glacial.....	4 mL	
(CH ₃ COOH)		
Azul de Metileno 1% ou		100 mL
		q.s.p.
Violeta de genciana.....	50 µL	

Um pequeno volume desta mistura foi despejado entre lâmina e lamínula na câmara de Neubauer. Conforme a contagem de células calculada, a suspensão (500 µL) foi ajustada para uma concentração final padrão de 4×10^6 células/mL na solução tampão.

2.2.3. ATIVAÇÃO DOS SOROS COM LIPOPOLISSACÁRIDE DE E. COLI

Alíquotas de soro (procedentes do *controle* ou do *paciente*) foram incubadas a 37°C durante 30 minutos em solução contendo extrato de lipopolissacáride de E. coli (serotipo 026:B6 Sigma Diagnostics, St. Louis, USA) na concentração de 100µg/mL para serem posteriormente utilizadas como estímulo quimiotático.

O preparo desta solução foi feito da seguinte forma:

Inicialmente foram adicionados 9 mL da solução tampão a 1 miligrama de LPS de *E. coli* e aliqotado em volumes contendo 900 μ L; antes de se fazer a incubação, adicionava-se um volume de 100 μ L do soro do *paciente* ou do *controle* a cada alíquota, obtendo-se, assim, um volume final de 1000 μ L na concentração desejada (100 μ g/mL).

Solução A*:

MNEM (meio mínimo essencial de Eagle)	9 mL	A*
<i>E. coli</i> (serotipo 026:B6)	1 mg.	

Alíquotas de 900 μ L da Solução A*.

Adição de Soro do *controle*100 μ L/900 μ L da Sol. A*

ou

Adição de Soro do *paciente*.....100 μ L/900 μ L da Sol. A*

2.2.4. CÂMARA DE QUIMIOTAXIA

Para o estudo da migração utilizou-se a técnica de BOYDEN (1962) modificada por ZIGMOND & HIRSCH (1973). A microcâmara de quimiotaxia do tipo -"multiwell chamber"- (Neuro Probe Inc. Cabin John, MD), de acrílico transparente, permite a realização de 48 ensaios, simultaneamente. Ela é constituída de dois compartimentos, um superior e um inferior.

No compartimento inferior o material foi distribuído em duplicatas de 25µL, volume máximo recomendado, para evitar a formação de "meniscos", contendo os estímulos a serem testados. A saber: a solução tampão, que representa a migração espontânea, o soro ativado do *paciente* em estudo e o soro ativado do *controle*.

O compartimento superior foi preenchido com a suspensão de PMNs do *paciente* e do *controle* também em duplicatas, porém contendo 50µL. Nenhum agente quimiotático foi utilizado neste compartimento.

Ambos compartimentos foram separados por um filtro de nitrato de celulose de 25x 80mm com poros medindo 5 micra (Neuro Probe, Inc., Cabin John, MD) umedecido previamente na solução tampão. O lado do filtro que entraria em contato direto com as células, foi identificado através de uma secção na borda superior esquerda. O modelo original da microcâmara foi descrito por FALK *et al.*(1980) e sofreu pequenas modificações com o passar dos anos.

Uma lâmina seca de microscopia foi posicionada diretamente sobre os poços do compartimento superior, com o objetivo de reduzir a evaporação durante a incubação e para prevenir rupturas nos espaços que separam os poços. O tempo de incubação dos PMNs foi sempre de 60 minutos em todos os casos, suficiente para as células depositarem-se na superfície do filtro e migrarem através deste.

Com esta distribuição foi possível estudar as mais variadas associações:

- 1- MIGRAÇÃO ESPONTÂNEA (ME) DE PMNs CONTROLE E DE PACIENTES (Anexo 7a).
- 2- MIGRAÇÃO DE PMNs DE CONTROLES E PACIENTES EM SEUS RESPECTIVOS SOROS ATIVADOS (Anexo 7a).
- 3- MIGRAÇÃO DE PMNs DE CONTROLES NO SORO ATIVADO DE DE PACIENTES (Anexo 7b).
- 4- MIGRAÇÃO DE PMNs DE PACIENTES NO SORO ATIVADO DE CONTROLES (Anexo 7b).
- 5- MIGRAÇÃO DE PMNs DE CONTROLES E PACIENTES EM SORO SEM ATIVAÇÃO (Anexo 7c).

A microcâmara de quimiotaxia foi incubada com o material referido acima, durante 60 minutos, a 37°C, em ar umidificado com 5% de CO₂. Após, foi feita a coloração do filtro, descrita a seguir (RICHARDS & McCULLOUGH, 1984):

- Metanol4 seg.
- Hematoxilina.....6 min.
- Água destilada.....imersão
- Etanol + HCl30 seg.
- Água destilada.....imersão
- Solução de Bluing2 min.
- Água destilada.....imersão
- Etanol 70%30 seg.
- Etanol 95%30 seg.
- Etanol absoluto 3 imersões2 min./cada
- Xylol 2 imersões.....2 min./cada

Realizada a coloração do filtro, foi imediatamente fixado em lâmina de microscopia. A imersão no xylol, última fase do processo de coloração, é quem clareia o filtro, indispensável para a contagem de células nas porções mais profundas do mesmo. Novas imersões em álcool podem ser necessárias, se no final do processo, o filtro ainda apresenta turvação, a fim de remover a água residual (WILKINSON *et al.*, 1988).

A leitura feita no **protocolo "A"** utiliza a técnica de "high power field"(WILKINSON *et al.*, 1988), fazendo a contagem de PMNs em duplicatas em dez campos, em um plano pré-estabelecido de 40 μ m a partir da malha superficial do filtro e, ao final, foi calculada a média final de células por campo.

2.3. ENSAIO COM SOROS NÃO INCUBADOS COM LPS (PROTOCOLO “PILOTO”)

O **protocolo “A”** foi complementado ao se analisar também a quimiotaxia dos PMNs de *controles* e *pacientes* cujos soros não foram incubados no LPS 10% (100µg/mL), isto é, soros não tratados. Para tal fim, selecionou-se oito *controles* e oito *pacientes*, que correspondem a população que inicialmente contribuiu com a implantação da metodologia do ensaio de quimiotaxia (Anexo 2). Em ambos os protocolos, foi determinado o índice funcional de quimiotaxia (IQ), calculado conforme a fórmula abaixo. Ela representa a porcentagem da média de migração em PMNs *controles*, pela média de migração em PMNs de *pacientes* x 100 (GROGAN, 1976; WARDEN *et al.*, 1975), inicialmente descrita na década de 1970 em estudos com soros de *pacientes* com queimaduras extensas. Nesta fórmula se relacionavam apenas dois grupos, o doente e o controle.

Adaptou-se este índice, que se mostrou ilustrativo o suficiente para correlacionar certas variáveis selecionadas, entre PMNs de *pacientes*, PMNs de *controles* e de cada grupo separadamente (Anexo 6). Em certos casos, os PMNs do próprio *paciente* estavam sendo testados na presença de um agente indutor da quimiotaxia (ex. LPS 10%) versus condições de migração espontânea (ME) no meio de cultura. Avaliamos também em circunstâncias semelhantes, os PMNs do *controle*. Na fórmula em baixo, utiliza-se o termo *neutrófilos ativados*, para indicar que esses foram incubados com LPS 10%.

- $$IQ = \frac{\text{média da migração de neutrófilos ativados do paciente}}{\text{média da migração de neutrófilos ativados do controle}} \times 100$$

Este índice foi calculado para cada *paciente* e/ou *controle*, assim como as médias, erro padrão da média (EPM) e quartis.

O Índice de Quimiotaxia dos *controles* (IQ_c), conforme adaptação da fórmula acima, é dado por:

- $$IQ_c = \frac{\text{média de migração dos neutrófilos controles no soro ativado}}{\text{média de migração dos neutrófilos controles na ME}}$$

De forma semelhante, o Índice de Quimiotaxia dos *pacientes* (IQ_p) é dado por:

- $$IQ_p = \frac{\text{média de migração dos neutrófilos do paciente no soro ativado}}{\text{média de migração dos neutrófilos do paciente na ME}}$$

2.4. PROTOCOLO "B"

No **protocolo "B"** (Anexo 3) estudou-se a quimiotaxia de PMNs de indivíduos sadios incubados com o soro de *pacientes*. Um total de 11 ensaios foi realizado com este material e os mesmos critérios de inclusão e exclusão referidos no **protocolo "A"**, foram aplicados.

O isolamento de PMNs foi realizado conforme a técnica de separação em duplo gradiente referida anteriormente. Dez mililitros de sangue periférico foram coletados para a obtenção do soro por centrifugação a 500 x g. durante 10 minutos, a 25°C. O soro de alguns doadores foi aliquotado e reutilizado em outros experimentos sendo conservado sob refrigeração a -15°C.

Este material, foi descongelado a temperatura ambiente antes do uso. Os PMNs *controle*, uma vez isolados, foram pré-incubados a 37°C durante 60 minutos com o soro do *paciente* (SP) e com o soro *controle* (SC) na concentração de 14×10^6 células/mL de soro.

Posteriormente, cada material foi centrifugado e ressuspendido na solução tampão na concentração de 4×10^6 células/mL e testado diante do agente indutor de quimiotaxia. Foi utilizado o lipopolissacáride de *E. coli* nas concentrações 1%(10 µg/mL), 3%(30 µg/mL) e 10%(100 µg/mL) e a solução tampão foi utilizada como meio controle para avaliar a migração espontânea (ME).

O compartimento inferior da microcâmara de quimiotaxia foi preenchido com 25µL do agente indutor, e o compartimento superior, com 50µL da suspensão de PMNs do doador, ambos em duplicatas. O filtro de nitrato de celulose que separa os compartimentos superior e inferior da câmara, foi posteriormente corado conforme descrito no **protocolo "A"**.

A quantificação da migração celular foi realizada em microscópio óptico com amplificação de 40 vezes. A técnica de leitura utilizada neste procedimento foi o "leading front" (ZIGMOND & HIRSCH, 1973). De início, focava-se o plano superior do filtro, onde era visível o maior número de células; a seguir com o auxílio do parafuso micrométrico, aprofundava-se o plano de observação microscópica até que, apenas, duas células fossem visíveis no campo.

A distância, medida em micrômetros (µm), entre o plano superior do filtro e aquele que continha duas células, permite avaliar a capacidade migratória das células na presença de um gradiente de concentração. A distância percorrida determina a migração dos PMNs de indivíduos sadios, previamente incubados com o soro de *pacientes* ou de *controle*, em direção ao agente quimiotático utilizado.

A leitura foi realizada em 5 campos em duplicatas e calculadas as médias e erro padrão.

3. PROCEDIMENTO LABORATORIAL

3.1. DOSAGEM DE CORTISOL SÉRICO

A determinação dos níveis de cortisol sérico (Anexo 4), foi realizada através de um ensaio imunoenzimático de tipo competitivo (Stratus[®] Cortisol Fluorometric Enzyme Immunoassay, Baxter Diagnostics Inc., Deerfield, IL). Este ensaio é capaz de dosar até 60 amostras por hora, com sensibilidade para níveis de cortisol em microgramas da ordem de 0.3µg/dL a 35µg/dL (GIELGEL *et al.*, 1982); cada amostra foi dosada em duplicatas e os níveis de normalidade levam em consideração o horário da coleta (ROLLERI *et al.*, 1976), isto é, das 05:00 às 10:00 h. o valor esperado está na faixa de 5.5 a 20 µg/dL (152-552nmol/L) e das 20:00 às 04:00 h. oscila entre 2-10 µg/dL (55,18-275,9nmol/L).

3.2. FRAÇÕES DO COMPLEMENTO SÉRICO

As frações C3c e C4 do complemento sérico foram dosadas por turbidimetria (Turbiquant[®], Behringwerke AG, Marburg, Germany). As proteínas contidas no soro humano, formam imunocomplexos numa reação imunoquímica com anticorpos específicos. A turvação produzida após essa mistura mede-se fotometricamente. As concentrações existentes são determinadas quantitativamente através da mensuração turbidimétrica da velocidade máxima de reação (método "peak-rate").

Os anti-soros utilizados para a determinação de ambas as frações, são obtidos através da imunização de coelhos, com as proteínas séricas humanas correspondentes. Os níveis de normalidade estão situados entre 50-90 mg/dL para a fração C3c, e entre 10-40 mg/dL para C4 (METZMANN, 1985; KELLER, 1986).

3.2.1. FRAÇÃO C3c

A molécula C3 é extremamente instável, dando lugar à formação de 2 proteínas, C3c e C3d, devido à ação de enzimas plasmáticas proteolíticas ou então pelo tempo prolongado de estocagem (Anexo 5).

No ensaio de C3c o anti-soro é direcionado contra o fragmento C3c da molécula C3. O processo de transformação de C3 para o C3c, molécula mais estável, deverá ter passado por vários graus, dependendo do tempo de coleta das amostras e das condições em que o material foi conservado.

Foi comprovado que em amostras recém-colhidas o C3c é detectado em porcentagem 30% menor, antes que a transformação se complete.

3.2.2. FRAÇÃO C4

Em relação ao C4 que também sofre transformação para um composto mais estável, verificou-se, porém, que este processo ocorre mais lentamente que no caso do C3c (Anexo 5).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Independente do teste estatístico utilizado, foram calculadas as médias e erro padrão da média (EPM), mediana e percentis, para cada variável que estava sendo avaliada nos ensaios. O teste t-Student, significativo para $p \leq 0.05$ foi aplicado em alguns ensaios com distribuição gaussiana. O teste-U de Mann-Whitney foi utilizado em ensaios com distribuição não gaussiana ($p \leq 0.05$). O teste de Kruskal-Wallis aplicou-se para análises com mais de 2 variáveis. Outros cálculos complementares que foram empregados são: análise de regressão, coeficientes de assimetria e de curtosis e o teste exato de Fisher.

Também dispôs-se de três softwares de apoio para o processamento dos dados: o Microstat (Ecosoft®, Inc., 1984, USA), o Statgraphics versão 2.6 e o Pharmacologic Calculation System (Pharma/PCS® versão 4.2, 1987).

IV. RESULTADOS

Neste estudo, o menor número de admissões foi observado em crianças entre 9 e 14 anos de idade, o que representou 21.4% das internações. As faixas de 1 a 5 e de 5 a 9 anos revelaram 45.5% e 33.1%, respectivamente (**Fig. 1**) com predomínio do sexo masculino (72.7%) e 27.3% do sexo feminino (**Fig. 2**).

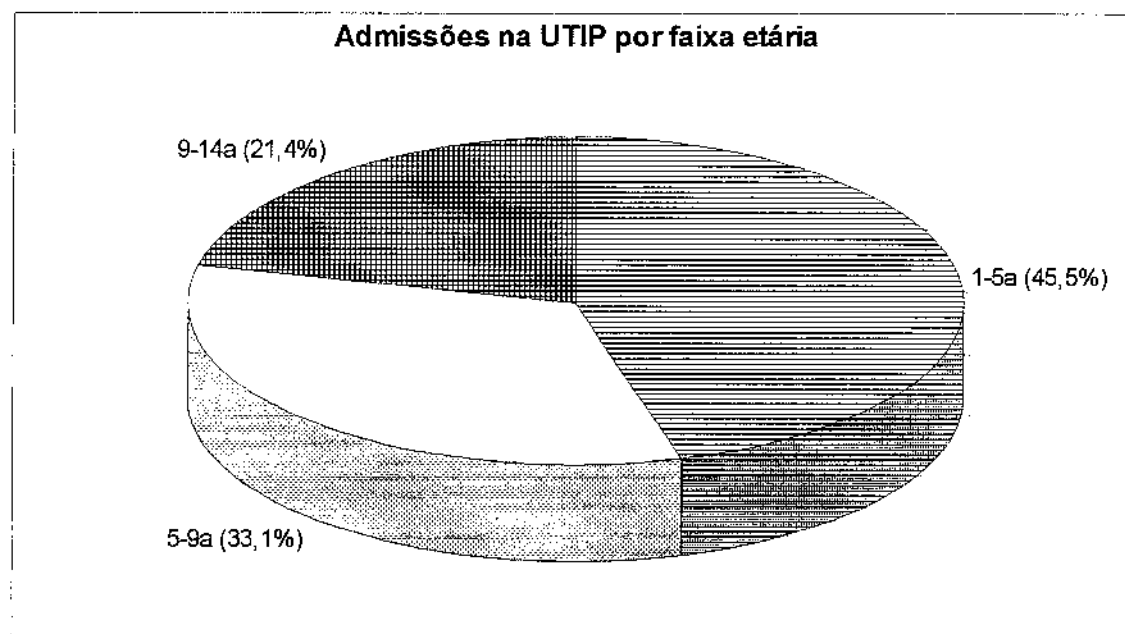


Fig. 1 Ilustra, em porcentagens, a distribuição do número de pacientes que participaram dos ensaios de quimiotaxia *in vitro* neste trabalho, conforme as faixas etárias propostas.

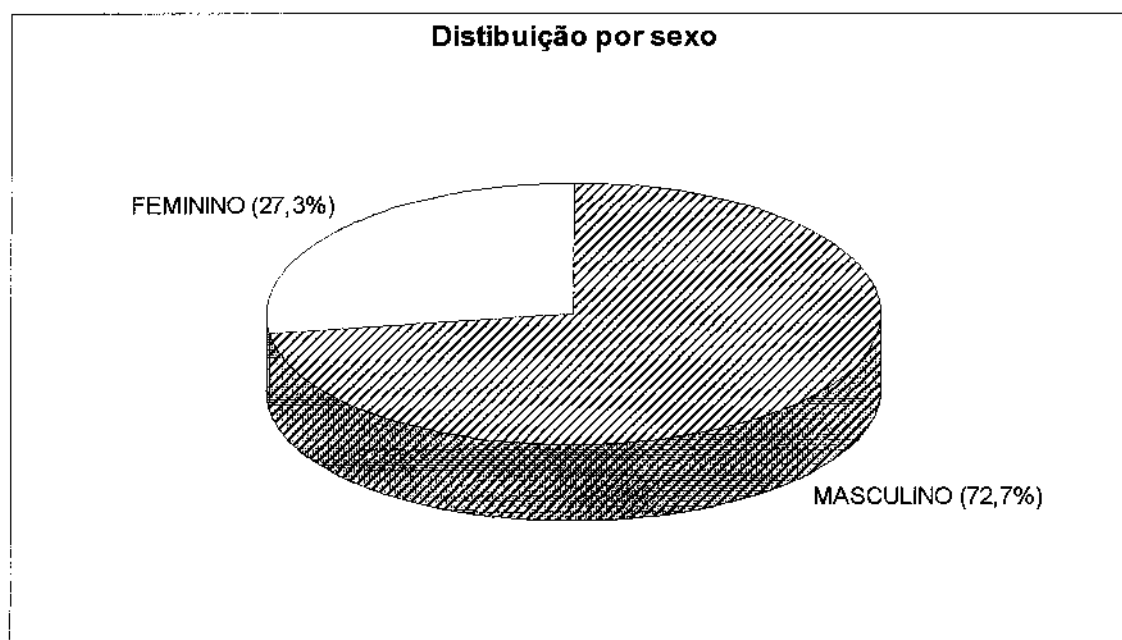


Fig. 2 Ilustra, em porcentagens, a distribuição por sexo, dos pacientes incluídos nos três protocolos clínicos de quimiotaxia *in vitro* padronizados neste trabalho.

A **Tabela 1** mostra, em detalhe, a relação dos 33 pacientes envolvidos no estudo, destacando-se em cada um deles, a idade, o sexo, o protocolo ao qual pertence ("piloto", "A" ou "B") e o diagnóstico clínico. A proporção de pacientes do sexo masculino em relação ao sexo feminino foi da ordem de 3:1. Em função disso, a correlação entre ambos os grupos fica parcialmente restrita, ao aplicarmos certas variáveis comparativas, tais como: dias de permanência na UTIP, sobrevida e mortalidade por faixa etária, incidência de patologias potencialmente infecciosas, capacidade de migração leucocitária em resposta a estímulos específicos, viabilidade dos polimorfonucleares, alterações hormonais e de proteínas plasmática, infecções adquiridas (infecção hospitalar), seqüelas, etc.

Tabela 1 PERFIL DA POPULAÇÃO EM 33 PACIENTES ESTUDADOS CONFORME A IDADE E SEXO. ESTE TOTAL INCLUI A PARTICIPAÇÃO NOS 3 PROTOCOLOS CLÍNICOS DE QUIMIOTAXIA *IN VITRO*

Nº	IDADE	SEXO	PROTOCOLO	DIAGNÓSTICO
1	1a	M	A	Pneumonia
2	4a	M	A	Traumatismo cranioencefálico
3	7a+	F	A	Sépsis(H. influenzae)
4	3a	M	A	Sépsis(criptogenética)
5	9a	M	A	PO-Cir. cardíaca
6	2a	M	A	Insuficiência respiratória
7	8a	M	A	Neoplasia(SNC)
8	2a	M	A	Sépsis(pneumococo)
9	11a	F	A	Traumatismo de tórax
10	1a	M	A	Infecção do trato urinário
11	1a +	F	A	Meningite(pneumococo)
12	7a	M	A	Sépsis(criptogenética)
13	3a	M	A	Choque hipovolêmico
14	12a	M	A	Choque hipovolêmico
15	14a	M	A	Traumatismo cranioencefálico
16	10a	M	A	Sépsis(E. coli)
17	6a	M	A	Falência de múltiplos órgãos
18	14a	M	B	Sépsis(criptogenética)
19	13a	M	B	Sépsis (estafilocócica)
20	2a	M	B	Broncopneumonia
21	9a	F	B	Encefalopatia hipertensiva
22	3a	M	B	Traumatismo cranioencefálico
23	13a	M	B	Traumatismo abdominal aberto
24	5a	M	B	Hemopneumotórax
25	6a+	F	P	Sépsis(criptogenética)
26	7a	F	P	Traumatismo abdominal
27	5a	F	P	Sépsis(criptogenética)
28	7a	M	P	Politraumatizado
29	5a	M	P	Politraumatizado
30	8a	M	P	Politraumatizado
31	11a+	M	P	Traumatismo cranioencefálico
32	5a	M	P	Traumatismo cranioencefálico
33	7a	F	P	Sépsis(criptogenética)

M= masculino, F= feminino P= protocolo Piloto, A= protocolo A, B=protocolo B
PO= pós operatório, SNC= sistema nervoso central, Cir= cirurgia, += óbitos

Para simplificar a interpretação dos resultados no que se refere a quimiotaxia, determinamos como padrão de normalidade na nossa amostra conforme a técnica de leitura utilizada, os valores apresentados pelo grupo de PMNs *controle* que foram previamente incubados no soro ativado do próprio *controle* com LPS 10% durante 60 minutos (**Tabela 2**).

Tabela 2 ANÁLISE DA QUIMIOTAXIA *IN VITRO* DE POLIMORFONUCLEARES DE CONTROLES INCUBADOS COM LPS A 10% EM SEUS RESPECTIVOS SOROS

Padrão de normalidade em PMNs controle	
	C/C
média±EPM	11,21±0,99
mediana	11,42
P 25%	8,72
P 75%	13,12
IC	9-13,4

EPM= Erro padrão da média, Quartis(percentil 25% e 75%)
 IC= Intervalo de confiança 95% (mínimo e máximo)
 C/C= Células por campo

O IQ dos *controles*(IQ_c) foi de 311.1±93.7 e o dos *pacientes* (IQ_p), 271.8±41 (**Fig. 3**). Como somente uma das populações tinha distribuição gaussiana -IQ_c- optou-se por testar a hipótese IQ_c>IQ_p, usando um teste não paramétrico (teste-U de Mann-Whitney), que descartou a hipótese com p=0.7920, por tanto, não significativa.

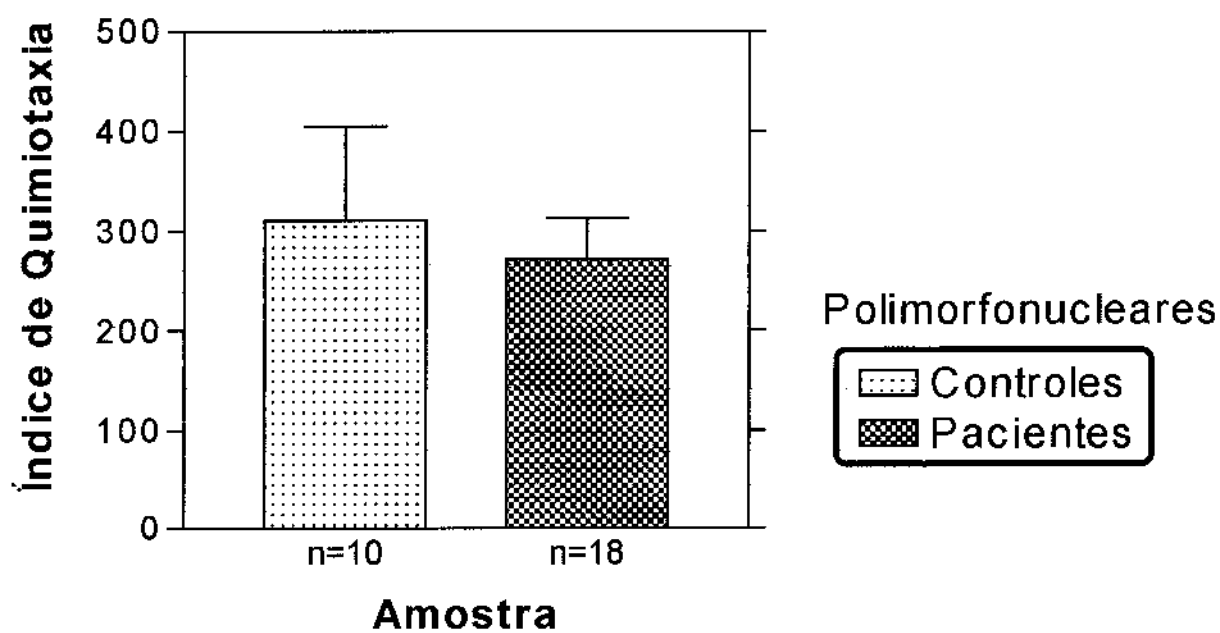


Fig. 3 Índices de quimiotaxia observados *in vitro* entre PMNs de controles (10) e PMNs de pacientes (18). Nas abscisas estão representadas as médias e o erro padrão da média. Nas ordenadas, o índice de quimiotaxia(x 100). n= número de controles e/ou pacientes.

Os resultados de cada ensaio proposto no **protocolo "A"** são apresentados a seguir.

1. MIGRAÇÃO ESPONTÂNEA (ME)

Para se avaliar a resposta dos PMNs *controle* diante do agente indutor de quimiotaxia, comparou-se a incubação destes em soro do próprio *controle* ativado com LPS a 10% e no meio de cultura sem estímulo (ME), que representou a migração espontânea. Observou-se que houve maior resposta migratória em torno de 100% ao se ativar o soro (**Fig. 4**). Em ambos os casos verificamos que a distribuição das amostras é normal. Testou-se a hipótese de que a migração seria menor no grupo de PMNs pré-incubados na ME (teste-U de Mann-Whitney).

A **Tabela 3** indica os resultados entre as duas amostras, destacando-se o grau de significância(* $p=0.0191$). Não houve correlação de proporcionalidade entre ambos, com $r= 0.3263$ e coeficiente de declividade 0.32 (Coeficiente de regressão).

A ativação do soro de *pacientes* (**Figura 4**) determinou também uma maior migração, face a condições de migração espontânea (ME). O grupo de *pacientes* incubados no meio (ME) não tinha distribuição gaussiana. Testada a hipótese de que o grupo incubado em soro com LPS 10% teria maior migração que os incubados em ME, confirmou-se que houve diferença significativa entre ambos (* $p=0.011$) conforme ilustração na **Tabela 3**. Através do coeficiente de regressão, observou-se que mantém relação diretamente proporcional entre si, significativa com coeficiente de declividade= 1.1 e intercepto= 0.8089.

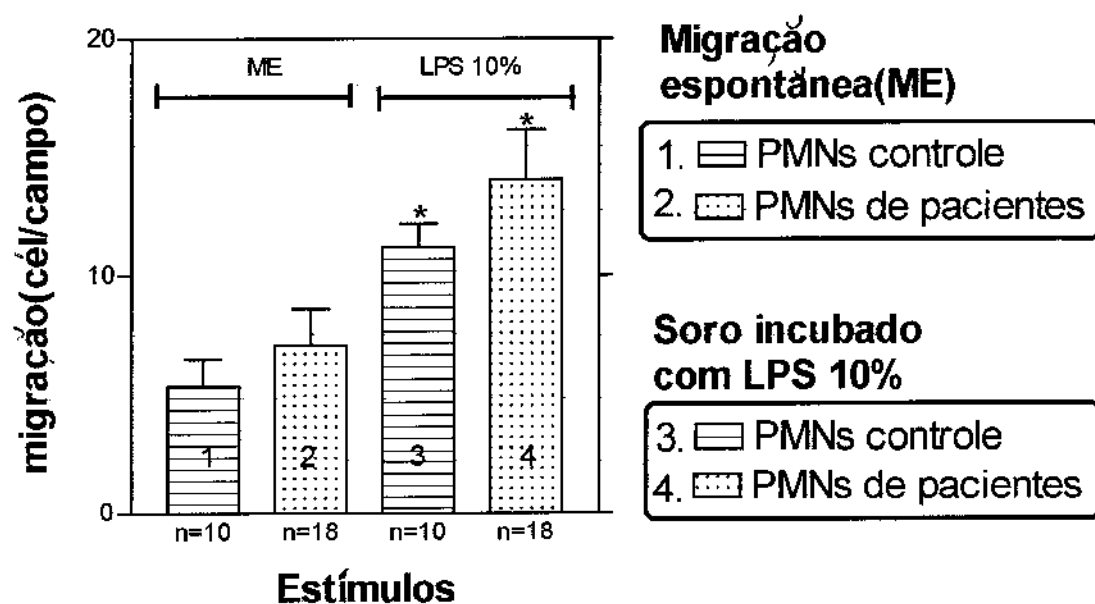


Fig. 4 Distribuição da população de PMNs de controles e de pacientes, incubados no meio de cultura (ME) e em seus respectivos soros contendo LPS 10%. As colunas, numeradas de 1 a 4, representam as médias e o erro padrão da média de cada grupo. Nas abscisas, n, representa o número de indivíduos que compõem cada grupo. Nas ordenadas, a unidade de migração é referida em células por campo. *=Estatisticamente significativo ($p \leq 0.05$).
 *= Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos 1 e 3, e, 2 e 4.

Tabela 3 DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES DE QUIMIOTAXIA *IN VITRO* DE PMNs DE CONTROLES E DE PACIENTES INCUBADOS NO MEIO DE CULTURA E EM SEUS RESPECTIVOS SOROS COM LPS 10%

	PMNs de Controles		PMNs de Pacientes	
	ME	Soro incubado LPS 10%	ME	Soro incubado LPS 10%
	cél/campo	cél/campo	cél/campo	cél/campo
média±EPM	5,4±1,1	11,2±0,9	7,1±1,5	14,0±2,1
mediana	4,25	11,42	5,2	11,3
P25%	3,92	8,72	2,1	6,9
P75%	5,95	13,12	9,2	21,9
		*p=0.019		*p=0.011
			NS	NS

*p= Estatisticamente significativo (Mann-Whitney)

NS= Não significativo (p>0.05)

ME= Migração espontânea

2. MIGRAÇÃO DE PMNs DE CONTROLES E PACIENTES EM SEUS RESPECTIVOS SOROS ATIVADOS

A incubação dos PMNs *controle* e de *pacientes* em seus respectivos soros ativados com LPS 10% (**Fig. 4**) mostra que houve maior atividade migratória nos *pacientes*. Sendo assim, testada esta hipótese, foram observados resultados (**Tabela 3**), demonstrativos de que não há diferenças entre esses grupos ($p > 0.05$), com $p = 0.7012$ (teste-U de Mann-Whitney). O índice de quimiotaxia (IQ) é de 87.4 ± 4.3 . Em vista da heterogeneidade da distribuição de ambas as populações, o teste t-Student seria pouco confiável, tendo-se optado por um teste não paramétrico. A heterogeneidade das amostras confirma-se mediante o coeficiente de homogeneidade de Cochran (*C= 0.855, significativo para $C \geq 0.781$ com $*p < 0.01$).

Em função disso, aplicou-se o coeficiente de assimetria(G1) e de curtosis(G2) em ambos os grupos, observando-se que na população de PMNs de *controles* incubados com LPS 10% não se afasta a probabilidade de haver distribuição gaussiana, sendo simétrica e mesocúrtica. Por outro lado, os PMNs de *pacientes* não apresentam distribuição gaussiana, existindo assimetria entre a população estudada, com desvio da curva para a direita(negativa).

Tabela 4 INDICADORES DE ASSIMETRIA E CURTOSSIS AVALIANDO A DISTRIBUIÇÃO DAS MÉDIAS DE QUIMIOTAXIA *IN VITRO*, OBSERVADAS ENTRE PMNs DE CONTROLE E DE PACIENTES INCUBADOS EM SEUS SOROS RESPECTIVOS COM LPS 10%

	ASSIMETRIA(G1)	CURTOSSIS(G2)
Controles	0,2068±0,54 (z=0.37)	1,067±1,15 (z=0.929)
Pacientes	-8,648±0,54 (z=-15,73)	25,93±1,15 (z=22.36)

G1= Indicador de assimetria

G2= Indicador de curtosis

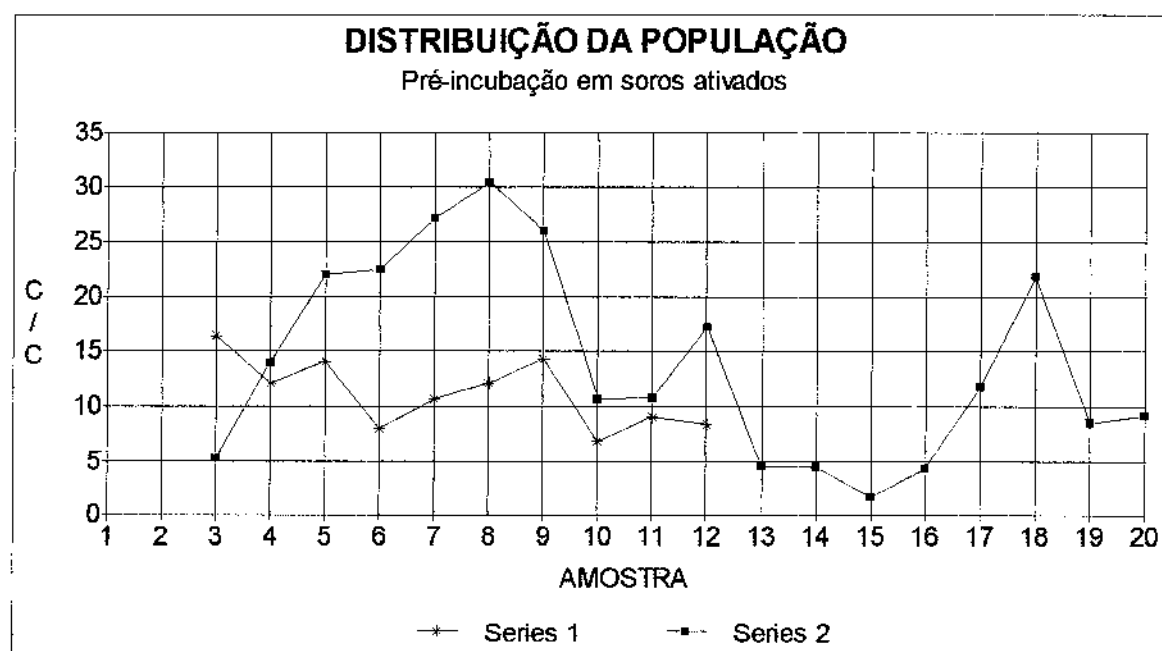


Fig. 5 Distribuição da quimiotaxia *in vitro* de PMNs de controles e de pacientes, incubados em seus respectivos soros em LPS 10%. Nas abscissas, a série 1 simboliza, em "asterisco", 10 controles e a série 2, em "quadrados pretos", 18 pacientes. Nas ordenadas, a unidade de migração é representada em células por campo (C/C).

3. MIGRAÇÃO DE PMNs CONTROLE INCUBADOS NO SORO DO PACIENTE

Ao incubar os PMNs de *controles* e os PMNs de *pacientes*, em soro de *pacientes* ativado com LPS 10%, foi possível observar que houve menor migração no grupo de *controles* do que no grupo de *pacientes* (**Fig. 6**), ambos com distribuição gaussiana. O índice de quimiotaxia da população foi de 140 ± 2.1 . A **Tabela 5** relaciona os dados a serem avaliados com a análise estatística em destaque. Foi testada a hipótese de que os PMNs *controle* migraram menos que os de *pacientes*, confirmada pelos cálculos estatísticos (* $p < 0.05$ com $t = 1.717$, t-Student significativo se $t > 1,689$ com 16 graus de liberdade). O teste-U de Mann-Whitney rejeitou a hipótese testada, com $p = 0.318$).

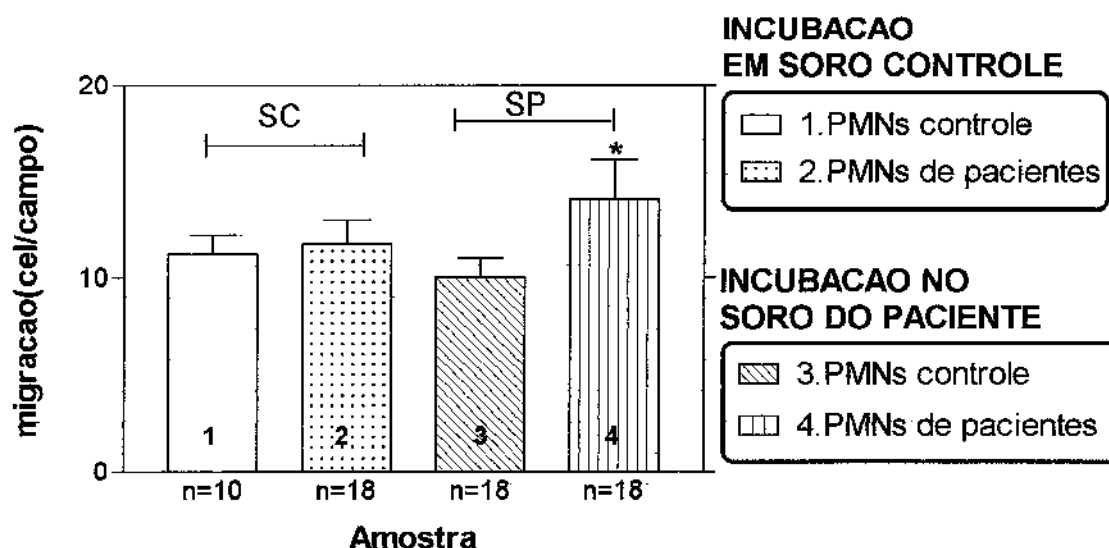


Fig. 6 O efeito da incubação de PMNs de controles e de pacientes em soros heterólogos, foi comparado com a incubação dos mesmos em seus respectivos soros. As colunas 1 e 2, representam a incubação em soro controle, sem valor estatisticamente significativo. As colunas 3 e 4, referentes a incubação em soro de pacientes, mostram diferenças significativas entre os PMNs.

Tabela 5 DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES DE QUIMIOTAXIA *IN VITRO* DE PMNs CONTROLE E DE PACIENTES PRÉ-INCUBADOS EM SEUS RESPECTIVOS SOROS (AMBOS OS SOROS ATIVADOS COM LPS DE E. COLI 10%) E EM SOROS HETERÓLOGOS

	SC		SP	
	PMNs controle C/C	PMNs pacientes C/C	PMNs controle C/C	PMNs pacientes C/C
média±EPM	11,21 ±0,99	11,75±0,99	10,03±0,99	*14,03±2,11
mediana	11,42	11,42	9,3	11,3
P25%	8,72	8,05	7,35	6,9
P75%	13,12	16,5	11,55	21,9
valor p		0.8667		*p<0.05

SC= Soro controle, SP= Soro do paciente

*p<0.05 = Estatisticamente significativo

4. MIGRAÇÃO DE PMNs DE PACIENTES INCUBADOS NO SORO DE CONTROLES:

Graficamente podemos observar (**Fig. 6**) que os PMNs de *pacientes* têm uma tendência maior de migração que o grupo de *controles* após terem sido pré-incubados no soro de *controle*. Essa hipótese foi testada e descartada após a avaliação estatística. Aplicado o teste-U de Mann-Whitney com $p=0.8667$ (**Tab. 5**). O índice de quimiotaxia da população foi de 109.3 ± 1.4 .

5. MIGRAÇÃO DE PMNs CONTROLE E DE PACIENTES EM SORO NÃO ATIVADO

Para determinar se a ativação dos soros com LPS 10% em ambos os grupos exerceria uma ação específica e determinante no comportamento migratório dos polimorfonucleares, foram selecionados oito *controles* e oito *pacientes* que faziam parte do **protocolo** “Piloto” (Anexo 2), ambos os grupos com distribuição gaussiana, cujos soros não foram incubados com LPS 10% (**Fig. 7**). O grupo de PMNs de *pacientes* apresentou maior migração que o grupo de PMNs de *controles*, hipótese confirmada (**Tabela 6**), com a avaliação estatística, após testada (* $p=0.0028$, teste-U de Mann-Whitney).

De forma semelhante, ao comparar a quimiotaxia dos PMNs *controle* incubados em soro não contendo LPS -**protocolo** “Piloto”- com os PMNs *controle* incubados em soro ativado com LPS (indivíduos sadios do **protocolo** “A”), verificou-se que estes últimos migraram mais, o que se confirmou estatisticamente (* $p=0.0026$, teste-U de Mann-Whitney) na **Tabela 6**.

Finalmente, a quimiotaxia dos PMNs de *pacientes* incubados em soro não contendo LPS -**protocolo** “Piloto”- ao serem comparados aos PMNs de *pacientes* em soro ativado com LPS (*pacientes* do **protocolo** “A”), não apresentou diferença significativa ($p=0.697$, teste-U de Mann-Whitney), embora os últimos tenham migrado mais.

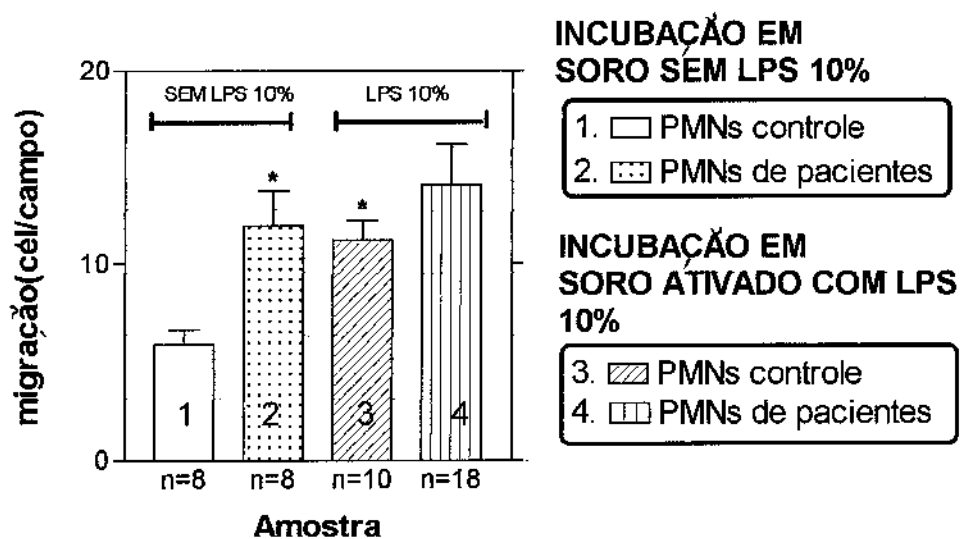


Fig. 7 Distribuição gráfica das médias de quimiotaxia *in vitro* de PMNs controle e de pacientes, incubados em soros ativados com LPS 10% (integrantes do protocolo "A") ou sem ativação (integrantes do protocolo "piloto").

*= Estatisticamente significativo

*Colunas 2 e 3, significativas em relação à coluna 1.

As colunas 2 e 4, não apresentam grau de significância.

Tabela 6 ANÁLISE DA QUIMIOTAXIA *IN VITRO* DE PMNs DE CONTROLES E DE PACIENTES, PRÉ-INCUBADOS EM SOROS ATIVADOS COM LPS 10% OU SEM ATIVAÇÃO

	Soro sem LPS 10%		Soro com LPS 10%	
	PMNs controle c/c	PMNs pacientes c/c	PMNs controle c/c	PMNs pacientes c/c
média±EPM	5,88±0,73	11,93±1,74	11,21±0,99	14,03±2,11
mediana	6,3	12,45	11,42	11,3
P25%	4	8,25	8,72	6,9
P75%	7,3	15,9	13,12	21,9
p		*p=0.0028	*p=0.026	0.697

*p= Estatisticamente significativo

Entre os pacientes não se observam diferenças significativas

6. MIGRAÇÃO DE PMNs POR PATOLOGIAS

A amostra de pacientes que participaram do estudo caracteriza-se por crianças gravemente enfermas, com uma heterogeneidade de patologias das mais diversas, porém a maioria apresentava semelhanças relativamente a certos itens, tais como o amplo uso de antibióticos, procedimentos invasivos para mensuração de variáveis hemodinâmicas, coleta de exames laboratoriais, punções para culturas de material, uso de respiradores, materiais para aspiração de secreções, etc. Todas estas condições criam diretamente uma situação de “estresse” num ambiente potencialmente propício para a aquisição de infecções hospitalares.

Em vista dessa heterogeneidade, optou-se por uma classificação em patologias de tipo *infeciosas* e *não infecciosas* entre os *pacientes* do **protocolo “A”** (**Tabelas 7 e III.1**). De uma forma geral, as *não infecciosas* incluem, predominantemente, patologias relacionadas a traumas e pós-operatórios; as *infeciosas* abrangem condições patológicas com um foco infeccioso bem caracterizado no decorrer da evolução, favorecendo disseminação sistêmica à distância ou complicações diretamente relacionadas a este.

Com base nessa classificação, os PMNs de cada tipo de patologias foram avaliados separadamente *in vitro*, a fim de se determinar se existem diferenças substanciais que permitam caracterizar a quimiotaxia dessas populações. Sete *pacientes* eram portadores de patologias *não infecciosas* e onze, de patologias *infecciosas* (Anexo 8).

Embora a média no grupo das *não infecciosas* tenha sido maior que no das *infecciosas*, essa diferença não foi significativa, com $p=0.2768$ confirmada com o teste-U de Mann-Whitney (**Fig. 8a**). Ao serem comparadas, separadamente, com o valor padronizado como normal neste estudo, também não se detectaram diferenças. O índice de quimiotaxia dos PMNs no grupo das *não infecciosas* foi de 131 ± 3 e o das *infecciosas*, de 120 ± 3 .

Dentro do grupo de doenças *infecciosas*, fez-se um subgrupo, constituído por 5 casos de septicemia e 1 caso de meningite bacteriana (**Fig. 8b**). Observou-se que 4 *pacientes* sépticos (80%) apresentavam quimiotaxia maior ou igual a média de normalidade e 1 (12.5%), estava inferior a essa faixa. O *paciente* com meningite bacteriana (*S. pneumoniae*), tinha quimiotaxia abaixo da normalidade.

Tabela 7 ANÁLISE DA QUIMIOTAXIA *IN VITRO* DE PMNs DE PACIENTES INCUBADOS EM SEUS RESPECTIVOS SOROS COM LPS 10%, PORTADORES DE PATOLOGIAS INFECCIOSAS E NÃO INFECCIOSAS

	Quimiotaxia por patologias	
	Não infecciosas c/c	Infecciosas c/c
média±EPM	15,52±3,3	13,09±2,8
mediana	14	9,2
P 25%	11,3	4,95
P 75%	21,6	21,9
p		p=0.2768

EPM= Erro padrão da média, P= Percentis

c/c: células por campo, p= Estatisticamente não significativo

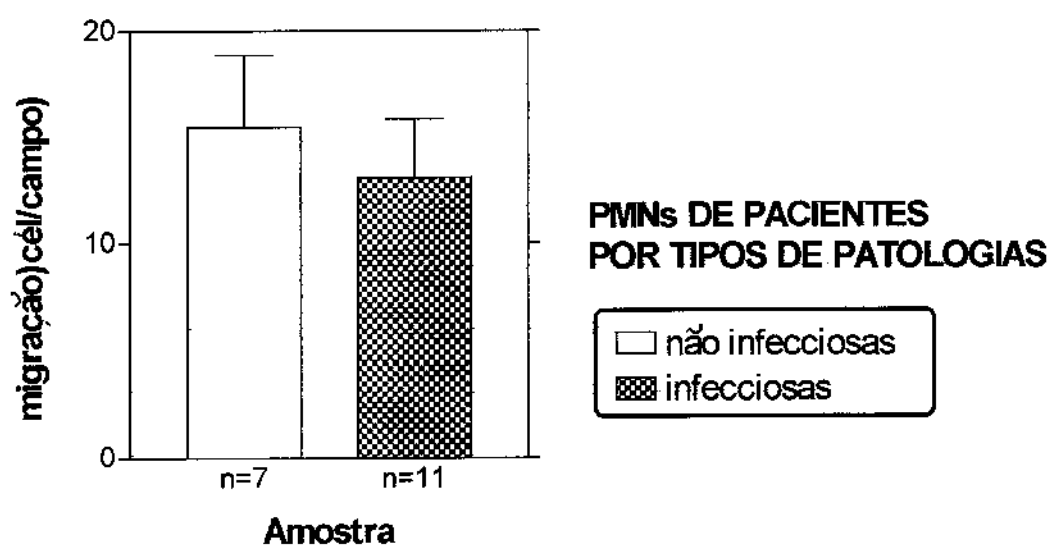


Fig. 8a Distribuição gráfica das médias de migração de PMNs de pacientes incubados em soro com LPS 10%, portadores de patologias infecciosas e não infecciosas.
n= Indica o número de pacientes em cada grupo.

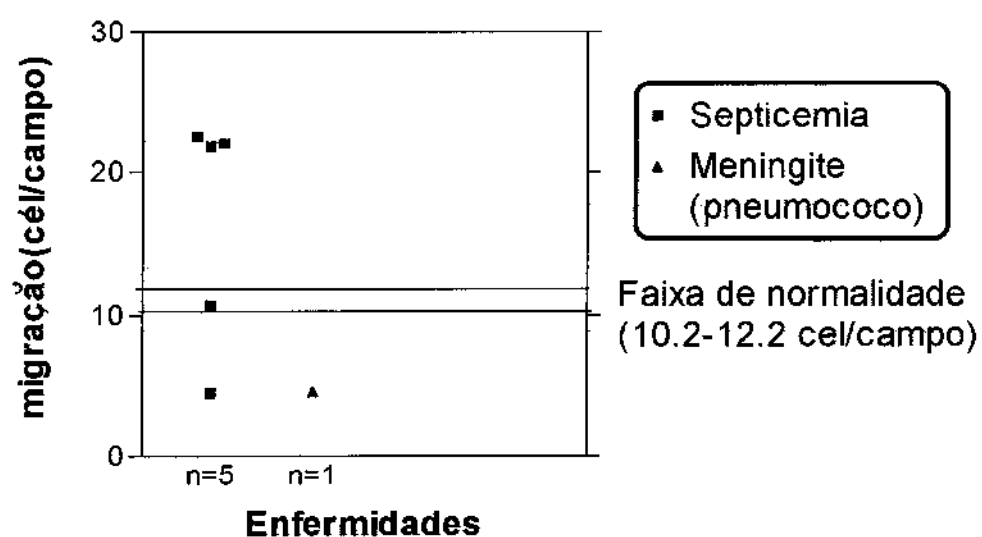


Fig. 8b Quimiotaxia de PMNs em 6 pacientes do Protocolo "A" portadores de patologias infecciosas, 5 com diagnóstico de sépsis e 1 paciente com meningite bacteriana. A faixa de normalidade delimita os valores de migração (células/campo), situados dentro, abaixo ou acima desta.

7. MIGRAÇÃO DE PMNs POR FAIXA ETÁRIA:

A população estudada foi dividida e classificada em três grupos (Anexo 9):

de 1 a 5 anos;
maiores de 5 até 9 anos;
e maiores de 9 até 14 anos.

Os índices de quimiotaxia são 95.4 ± 3.7 , 196 ± 4 e 100 ± 1 , respectivamente.

Os pacientes do segundo grupo apresentaram maior migração que os outros, porém sem significado estatístico. O teste de Kruskal-Wallis confirmou os resultados, com $p=0.711$. A **Fig. 9** e a **Tabela 8** complementam esta afirmação.

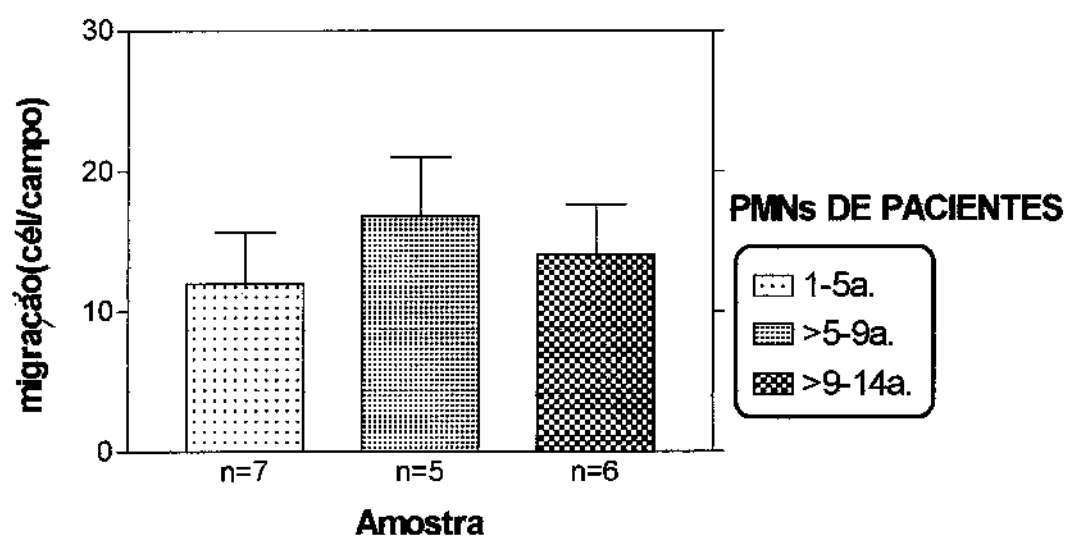


Fig. 9 Distribuição gráfica das médias de migração de PMNs de pacientes incubados em seus respectivos soros com LPS 10%, classificados em 3 faixas etárias que estão representadas em cada coluna.
n= número de pacientes.

Tabela 8 ANÁLISE DA QUIMIOTAXIA *IN VITRO* DE PMNs DE 18 PACIENTES INCUBADOS EM SORO ATIVADO COM LPS 10%, DISTRIBUÍDOS EM TRÊS GRUPOS POR FAIXAS ETÁRIAS,

	Grupo I	Grupo II	Grupo III
	1-5a. C/C	>5-9a. C/C	>9-14a. C/C
média±EPM	12±3,7	16,84±4,2	14±3,5
mediana	10,7	22	11,3
P25%	4,95		9,65
P75%	15,6		16,8
n	7	5	6
	NS	NS	NS

NS= Estatisticamente não significativo

n= número de pacientes

C/C= células por campo

8. RELAÇÃO DO NÚMERO DE LEUCÓCITOS ENTRE CONTROLES E PACIENTES.

A contagem absoluta de leucócitos foi maior nos *pacientes* que nos *controles*, apesar da ampla variação existente nos primeiros (**Fig. 10**), com cifras chegando até 105% acima dos valores médios encontrados nos *controles*. A hipótese foi testada e rejeitada pelo teste-U de Mann-Whitney, com $p=0.179$. Como a amostra de leucócitos de *pacientes* tenderia a uma distribuição normal, dependendo de um maior número de casos, foi também aplicado o teste paramétrico, t-Student com $*p<0.05$ significativo para 25 graus de liberdade. A **Tabela 9** ilustra a análise numérica de ambos os grupos, destacando os valores de significância.

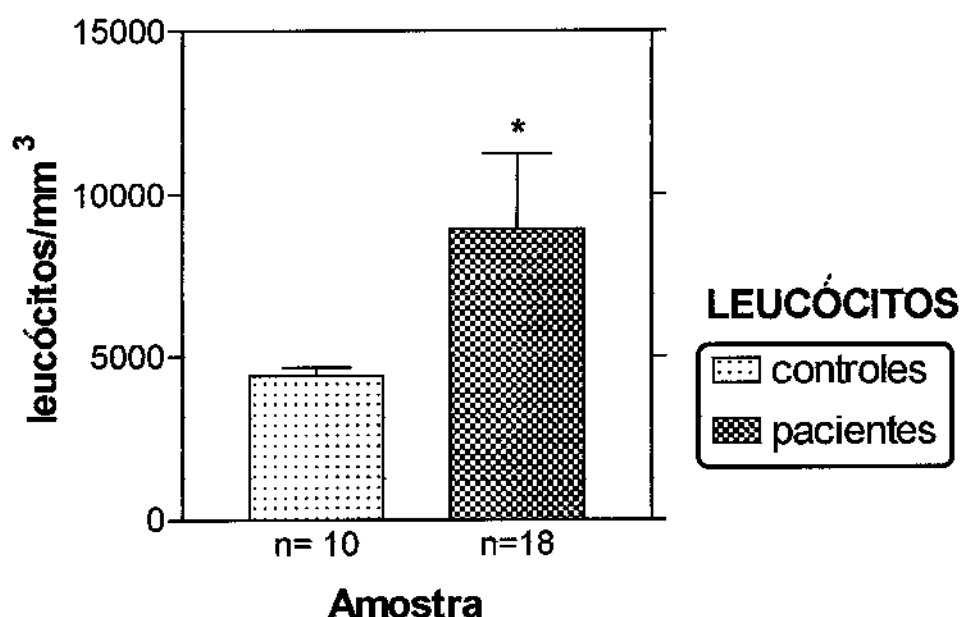


Fig. 10 Distribuição gráfica das médias da contagem absoluta de leucócitos de controles e pacientes que participaram dos ensaios de quimiotaxia *in vitro*.

n= número de pacientes e/ou controles.

*= Estatisticamente significativa

Tabela 9 ANÁLISE DA CONTAGEM ABSOLUTA DE LEUCÓCITOS DE CONTROLES E PACIENTES, QUE PARTICIPARAM DO ENSAIO DE QUIMIOTAXIA *IN VITRO*.

	Leucócitos controle	Leucócitos de pacientes
média±EPM	4400±253	9270±2470
mediana	4400	6072
P 25%	4156	4400
P 75%	4775	8772

*p<0.05

PROTOCOLO B

No **protocolo "B"**, avalia-se a migração de PMNs *controle* que foram previamente incubados, durante 60 minutos a 37°C, em soro de *controles* e em soro de *pacientes*, na tentativa de caracterizar, isoladamente, o comportamento migratório destas células diante do agente indutor de quimiotaxia -LPS (*E. coli*)- em três concentrações diferentes: 1%, 3% e 10%. A mesma solução tampão utilizada no **protocolo "A"** contendo o meio mínimo essencial de Eagle (MNEM), foi usado como meio de cultura para avaliar a migração espontânea (ME).

O banco de soro continha alíquotas de 6 *controles* e de 7 *pacientes*, conservadas a -15°C, algumas sendo reutilizadas. Os polimorfonucleares foram isolados conforme o método descrito anteriormente, perfazendo um total de 11 ensaios. A técnica de "leading front" (ZIGMOND & HIRSCH, 1973) foi padronizada nesse **protocolo** como ferramenta de leitura, sendo representada em micrômetros (μm).

MIGRAÇÃO DE PMNS NO SORO DE CONTROLES (Anexo 10)

Observa-se com clareza que houve, gradativamente, maior migração de PMNs quando o estímulo indutor da quimiotaxia estava na concentração de LPS a 3%. A partir daí, na concentração a 10%, ocorre uma queda súbita da migração (**Fig. 11**).

Dois testes foram utilizados para comparar a quimiotaxia de PMNs de indivíduos sadios, incubados no meio de cultura (ME) e nas três concentrações de LPS utilizadas no ensaio. Observou-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre cada uma delas e o meio (teste-U de Mann-Whitney), ou entre o meio e as três concentrações em conjunto (teste de Kruskal-Wallis). Os 4 grupos apresentavam distribuição gaussiana. A análise completa dos dados aparece representada na **Tabela 10**.

Tabela 10 ANÁLISE DA QUIMIOTAXIA *IN VITRO* DE PMNs DE INDIVÍDUOS SADIOS, INCUBADOS EM SORO DE CONTROLES, QUE PARTICIPARAM DOS ENSAIOS COM LPS DE E. COLI, UTILIZADO COMO AGENTE INDUTOR DE QUIMIOTAXIA EM TRÊS CONCENTRAÇÕES

	Estímulos			
	ME	LPS 1%	LPS 3%	LPS 10%
média±EPM	51,54±6,6	66,81±6,7	67,45±7,2	56,92±6,6
mediana	57	68	70	60
P 25%	41,54	60,5	53,5	34,5
P 75%	66,5	79,5	86	74
Valor p		p=0.1071	p=0.1147	p=0.6453

EPM=Erro padrão da média, P= Percentis

ME= migração espontânea

Obs.: p=0.6216 entre a ME e as três concentrações em conjunto

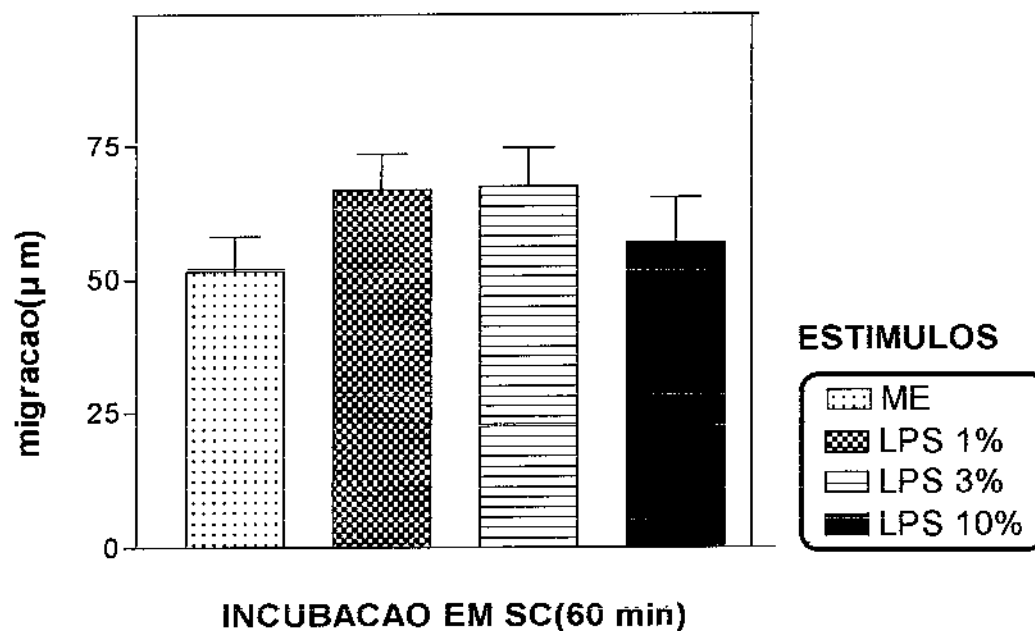


Fig. 11 Distribuição gráfica das médias de migração, em 11 ensaios, com PMNs de indivíduos sadios, incubados em soro de controles durante 60 min a 37°C. LPS a 1, 3 e 10% foi utilizado como agente indutor da quimiotaxia. ME= migração espontânea no meio de cultura. SC= Soro de controles.

MIGRAÇÃO DE PMNs NO SORO DE PACIENTES (Anexo 11)

De forma semelhante ao ocorrido na incubação com o soro de *controles*, nota-se que na concentração de LPS 3%, a migração de PMNs de indivíduos sadios incubados em soro de *pacientes*, atinge seu máximo, sofrendo então uma queda da migração ainda maior que a observada no soro de *controles* quando o agente utilizado é LPS 10% (**Fig 12 e Tab. 11**). O teste-U de Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a quimiotaxia desses indivíduos entre o meio (ME) e cada concentração de LPS. O Kruskal-Wallis analisa os resultados entre o meio e as três concentrações de LPS em conjunto. Os 4 grupos apresentavam distribuição gaussiana.

Tabela 11 ANÁLISE DA QUIMIOTAXIA *IN VITRO* DE PMNs DE INDIVÍDUOS SADIOS, INCUBADOS EM SORO DE PACIENTES, QUE PARTICIPARAM DOS ENSAIOS COM LPS DE *E. COLI*, UTILIZADO COMO AGENTE INDUTOR DE QUIMIOTAXIA EM TRÊS CONCENTRAÇÕES

	Estímulos			
	ME	LPS 1%	LPS 3%	LPS 10%
média±EPM	34±5,7µm	44,54±6,5µm	52,89±7µm	35,67±5µm
mediana	33	48	58	36
P 25%	26,5	29,5	42,5	21,5
P 75%	46,5	58	65,2	48,5
Valor p		p=0.264	*p=0.0414	p=0.9476

EPM= Erro padrão da média, P= Percentis

*p= Estatisticamente significativo, ME= Migração espontânea

Obs.: p=0.1274 entre o meio e as três concentrações em conjunto

Ao correlacionar a quimiotaxia de PMNs de indivíduos sadios incubados no meio de cultura (ME) com a incubação em cada concentração de LPS, não se observaram diferenças significativas (teste-U de Mann-Whitney). De forma semelhante, o teste de Kruskal-Wallis, também rejeitou a hipótese de existirem diferenças significativas comparando-se as três concentrações de LPS em conjunto com a incubação no meio (ME). Os 4 grupos dessa análise têm distribuição gaussiana.

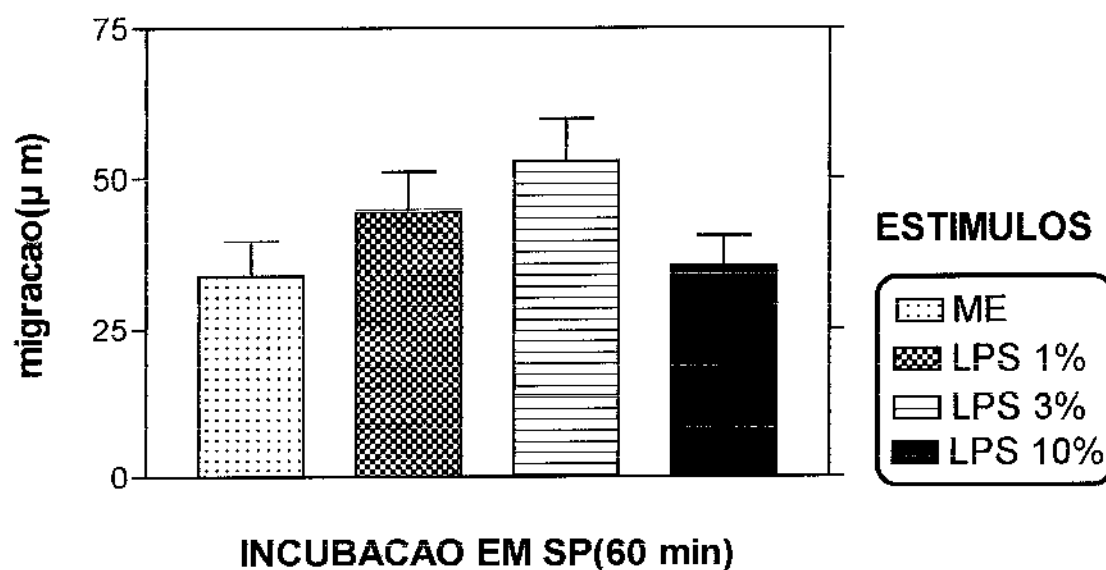


Fig. 12 Distribuição gráfica das médias de migração em 11 ensaios com PMNs de indivíduos sadios, incubados em soro de pacientes durante 60 min a 37°C. LPS a 1, 3 e 10% foi utilizado como agente indutor da quimiotaxia. ME= Migração espontânea no meio de cultura. SP= Soro de pacientes.

RELAÇÃO DA QUIMIOTAXIA DE PMNs DE INDIVÍDUOS SADIOS, INCUBADOS EM SOROS DE CONTROLES E DE PACIENTES

Na seções anteriores, observou-se, que uma vez que os PMNs atingiam um efeito migratório máximo, como ocorreu na concentração de LPS 3%, esta fase era seguida de uma queda da migração, cuja trajetória tende para valores próximos aos encontrados na migração espontânea. A união de pontos, para cada concentração do agente indutor de quimiotaxia, permitiu traçar uma trajetória da quimiotaxia referente a incubação em cada tipo de soro.

Quando os PMNs foram incubados no soro de *controles* observou-se maior migração para cada ponto (migração espontânea, LPS a 1%, LPS 3% e LPS 10%) do que na incubação em soro de *pacientes*. Esta hipótese, foi testada com testes não paramétricos e confirmada. As **Fig. 13 e 14** representam a relação das médias de migração de PMNs de indivíduos sadios, correspondentes a cada estímulo e ao meio em que foram incubados. Todas as variáveis apresentavam distribuição gaussiana.

Os valores calculados para a migração espontânea e para cada estímulo são: na ME, $*p=0.05$ com 10 graus de liberdade; em LPS 1%, $*p=0.027$; em LPS 3%, $*p=0.048$ e, em LPS 10%, $*p=0.051$

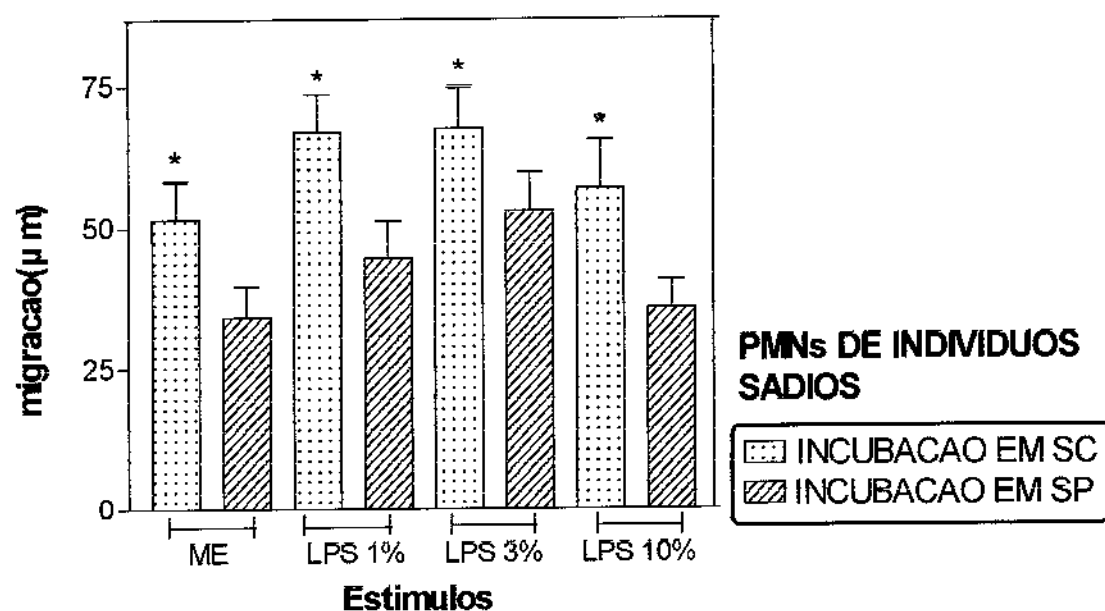


Fig. 13 Distribuição gráfica das médias e erro padrão da média da migração de PMNs de indivíduos saudáveis, incubados com soro de controle e/ou soro de pacientes. Seis controles e sete pacientes participaram do estudo, no qual foram realizados 11 ensaios *in vitro*. ME= migração espontânea. SC = Soro de controles, SP= Soro de pacientes. As porcentagens referem-se as concentrações de LPS. *= Estatisticamente significativo

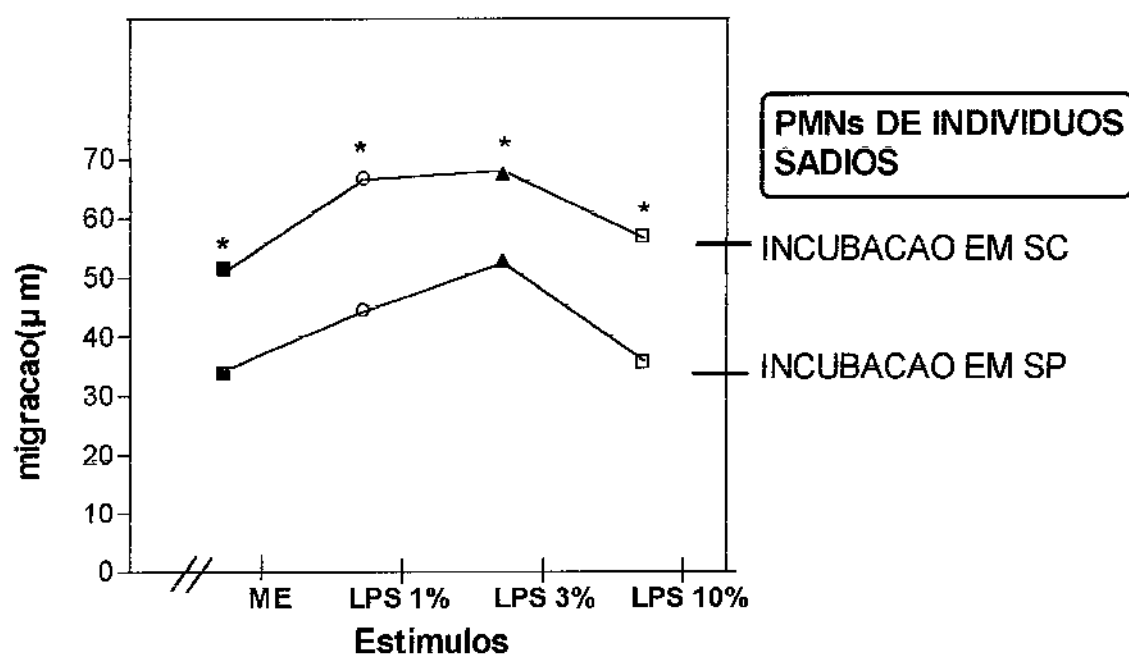


Fig. 14 PMNs de indivíduos sadios foram incubados em soro de controles e em soro de pacientes (60 min, 37°C) antes de serem testados. LPS a 1, 3 e 10% foi utilizado como agente indutor de quimiotaxia. Cada ponto da curva representa a média de 11 ensaios, feitos em duplicatas, com os soros de 6 controles e de 7 pacientes. ME= Migração espontânea. SC= Soro de controles. SP= Soro de pacientes. *= Estatisticamente significativo($p \leq 0.05$).

ESTUDOS HORMONAIS

CORTICOSTERÓIDES

Vinte e sete amostras de soro de *pacientes* e dezesseis do grupo *controle* foram analisadas para o estudo dos níveis de cortisol ($\mu\text{g/dL}$). Ambos os grupos apresentavam distribuição gaussiana.

O grupo de *pacientes* apresentou níveis de cortisol maiores que os *controles* (**Fig. 15a**). Essa hipótese foi testada e após, confirmada com base nos cálculos estatísticos.

Tabela 12 ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTISOL DE 27 PACIENTES E 15 CONTROLES. AS AMOSTRAS FORAM COLHIDAS ENTRE 9:00-10:30 H. EM AMBOS OS GRUPOS

	Controles $\mu\text{g/dL}$	Pacientes $\mu\text{g/dL}$
média $\pm$ EPM	13,17 $\pm$ 1,6	20,34 $\pm$ 1,7
mediana	11,6	20,6
P 25%	9,4	13,6
P 75%	15,3	27,2
p		*p=0.0056

EPM= Erro padrão da média, P= Percentis

*p=Estatisticamente significativo

O teste t-Student mostrou que há diferença significativa entre os grupos, com $t=2.765$ para um alfa de 0.05, com $*p= 0.008$. O teste-U de Mann-Whitney (não paramétrico) também confirmou os resultados, com $*p= 0.0056$ como demonstra-se na tabela acima. Em mais da metade dos *pacientes* estudados, verificou-se que 14/27 (52%), tinham níveis acima de $20\mu\text{g/dL}$ (551.8 nmol/L), 2/27 (7.4%) com valores inferiores a $5,5\mu\text{g/dL}$ ($151,74 \text{ nmol/L}$) e 11/27 (40.7%), dentro dos padrões de normalidade. O Anexo 12 discrimina em detalhes o nível sérico de cortisol encontrado em cada *controle* e/ou *paciente*.

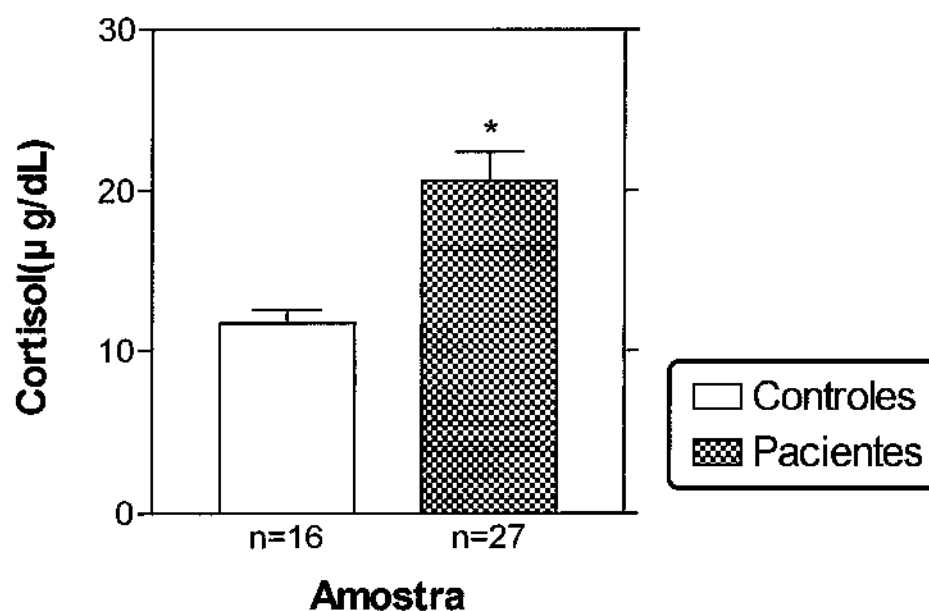


Fig.15a Distribuição gráfica das médias e erro padrão da média, dos níveis séricos de cortisol de controles e pacientes. n= número de indivíduos, *= estatisticamente significativo.

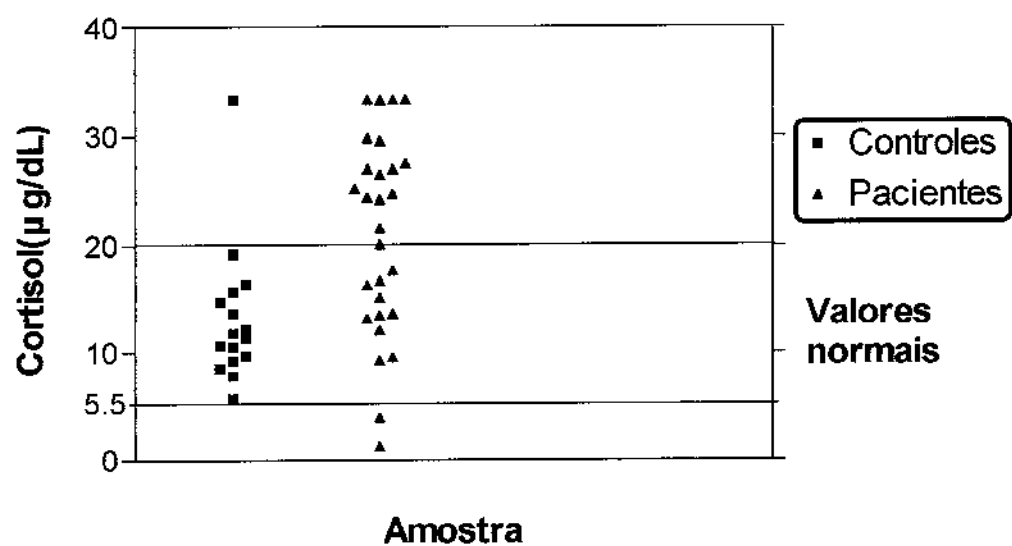


Fig. 15b Distribuição gráfica dos níveis séricos de cortisol de 27 pacientes e 16 controles, relacionados com a faixa de normalidade.

NÍVEIS DE CORTISOL E LEUCOCITOSE

Procurando correlacionar a contagem absoluta de polimorfonucleares com os níveis séricos de cortisol encontrados em cada grupo, verificou-se que tanto nos *controles* quanto nos *pacientes* não houve correlação significativa (**Fig. 16**) entre o cortisol sérico e o número de PMMs com $r = -0.0392$, intercepto = 12.1 e slope = -1.6 nos *controles* e $r = -0.0745$, com intercepto = 20.5 e slope = -6.8 nos *pacientes* (coeficiente de regressão).

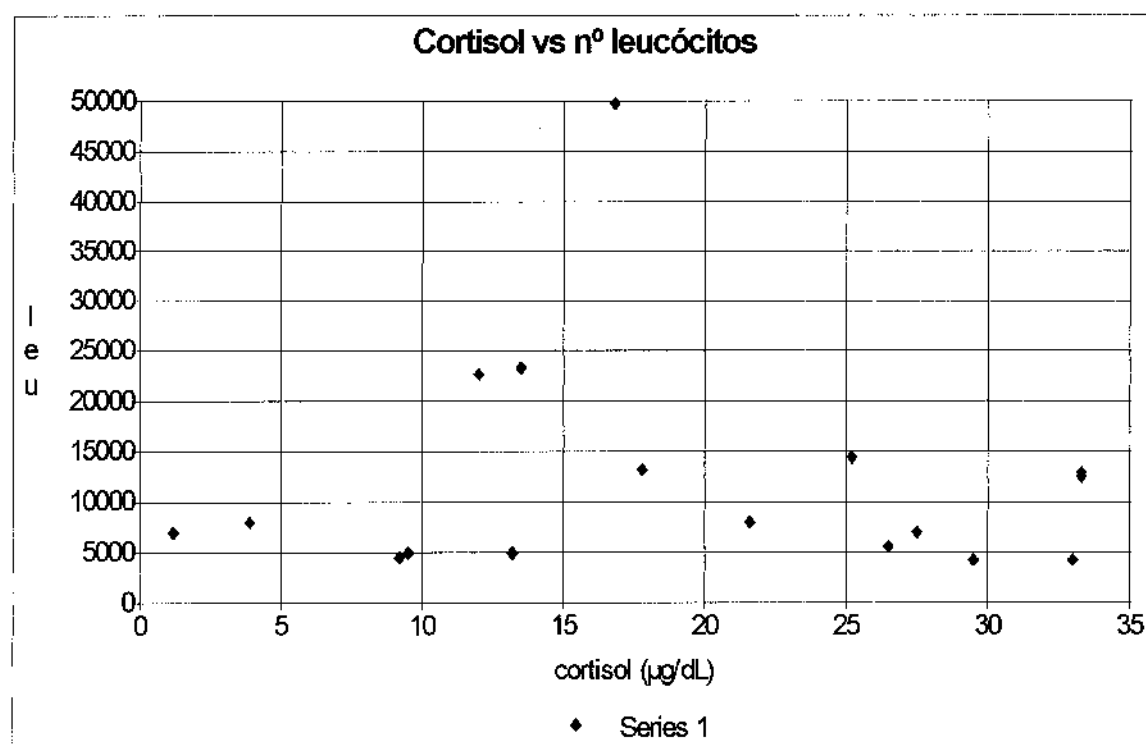


Fig. 16 Ilustração dos níveis de cortisol sérico de 17 pacientes que participaram dos ensaios de quimiotaxia *in vitro*, e sua correlação com o número absoluto de leucócitos (leu).

“Series 1”= representa a população de pacientes. Cada ponto da curva corresponde a um paciente. Entre 30 e 35µg/dL de cortisol, há dois pontos no gráfico, bem próximos, quase se sobrepondo.

NIVEIS DE CORTISOL E QUIMIOTAXIA

Ao se analisar os níveis de cortisol e a *migração* de polimorfonucleares de 17 *pacientes* que participaram do **protocolo "A"**, também não foi observada correlação entre estas duas variáveis, sendo, portanto, independentes com $r = -0.0684$, intercepto= 20.15 e slope=-7.70, conforme o coeficiente de regressão(**Fig. 17**).

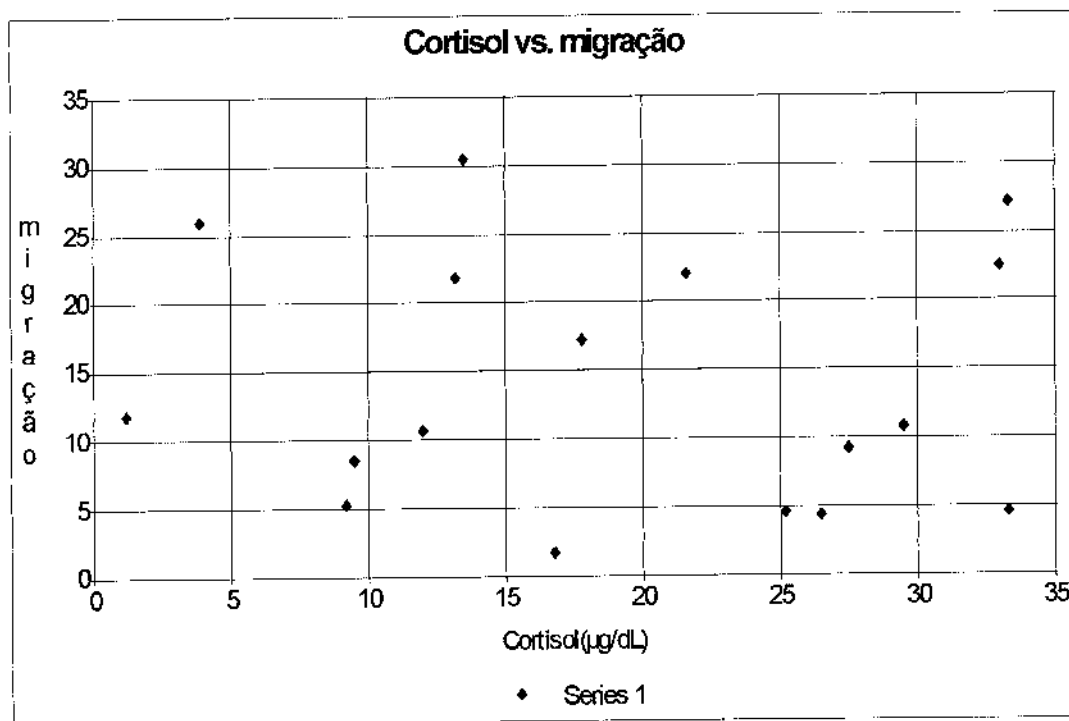


Fig. 17 Ilustração dos níveis de cortisol sérico de 17 *pacientes* que participaram dos ensaios de quimiotaxia *in vitro*, e sua correlação com a migração. Cada ponto da curva corresponde a um único *paciente*. "Series 1"= representa a população de *pacientes*. Nas *abs-cisas*, os níveis de cortisol (µg/dL). Nas *ordenadas*, a migração, em células por campo.

Com base nas especificações fornecidas pelo fabricante do kit utilizado na dosagem sérica do hormônio cortisol e em revisões de literatura reconhecida internacionalmente (ROLLERI *et al.*, 1976), tomou-se como faixa de normalidade os valores compreendidos entre 5.5-20µg/dL no horário das 05:00 às 10:00 h. que, de fato, é o tempo em que se observa o maior pico sérico, de acordo com o ciclo circadiano.

O menor pico situa-se entre as 20:00 e 04:00 h., sendo que em indivíduos normais já se observa uma queda significativa dos níveis no final da tarde, para valores em torno de 50% menores que os observados pela manhã.

Para melhor quantificar os níveis observados neste estudo, foi elaborada uma classificação simples que possibilitasse a interpretação dos resultados, visto que a variedade de métodos de diagnóstico, técnicas e padronizações são tão amplos que fogem aos objetivos desta experiência.

A classificação considerou como níveis baixos, os valores menores que 5µg/dL(<138nmol/L), normais de 5.5-20µg/dL (152-552nmol/L) e elevados, se maiores que 20µg/dL(>552nmol/L).

A **Tabela 12** ilustra quantitativamente a relação de indivíduos enquadrados nessas três faixas séricas. Observe-se a ilustração na **Fig. 18**.

Tabela 12 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CORTISOL DE CONTROLES E DE PACIENTES QUE PARTICIPARAM DOS ENSAIOS DE QUIMIOTAXIA *IN VITRO*. CADA GRUPO FOI DISTRIBUÍDO EM TRÊS FAIXAS SÉRICAS, DELIMITANDO NÍVEIS ACIMA, ABAIXO OU DENTRO DA FAIXA DE NORMALIDADE

	Controles			Pacientes		
	µg/dL <5.5	µg/dL 5.5-20	µg/dL >20	µg/dL <5.5	µg/dL 5.5-20	µg/dL >20
média±EPM	—	11,83±0,94	33,3	2,55±1,3	14,3±1,0	27,64±1,1
mediana	—	11,4	33,3	2,55	13,7	27
P 25%	—	9,4	—	—	12,6	24,6
P 75%	—	14,25	—	—	16,6	31,4
n	0	15	1	2	10	15
p						*p<0.01

EPM= Erro padrão da média, P= Percentis, n= número de indivíduos

*p= Estatisticamente significativo

Os *pacientes* com níveis de cortisol $\leq 20\mu\text{g/dL}$ (48%) e $>20\mu\text{g/dL}$ (52%) relacionados na **Tabela 12** aparecem representados na figura a seguir. Testou-se se haveria dependência dos níveis elevados de cortisol encontrados, com a presença de doença, fato que foi confirmado com o teste exato de Fisher, com $t = 0.0027$ e $*p = 0.0084$, de forma bilateral.

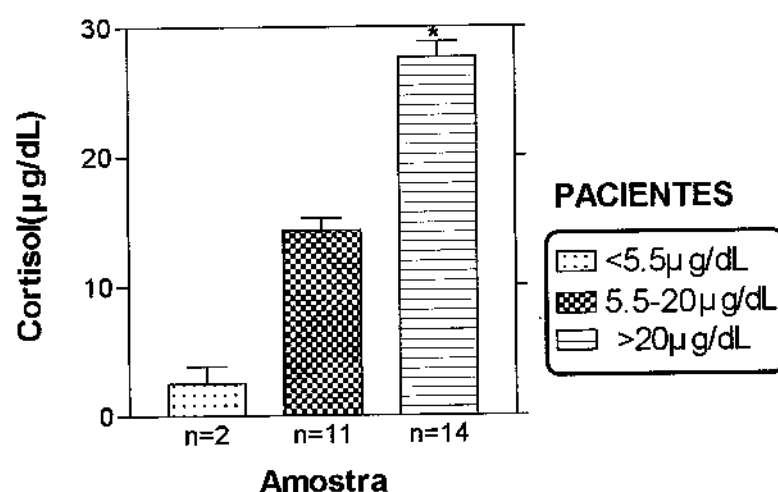


Fig.18 Distribuição gráfica das médias e erro padrão da média dos níveis séricos de cortisol de pacientes. Os valores séricos foram classificados em três faixas. A coluna do meio, representa a faixa de normalidade e corresponde a 11 pacientes. As colunas à esquerda e direita desta, referem-se aos valores abaixo e acima do normal. n= representa o número de indivíduos de cada faixa. *= Estatisticamente significativo (* $p < 0.05$).

FRAÇÕES DO COMPLEMENTO SÉRICO

NÍVEIS DE C3c (Anexo 5)

A **Figura 19** ilustra em 31 *pacientes* e 14 *controles* os níveis séricos de C3c; observe-se a relação das variáveis (**Tabela 13**) com a análise estatística mostrando as médias, mediana, P_{25} e P_{75} . Em ambos os grupos, há distribuição gaussiana.

Foi testada a hipótese de que os níveis de C3c em *pacientes* seriam menores que os dos *controles*, o que se observa com a análise das médias. Esta hipótese não se mostrou estatisticamente significativa, com $p=0.1412$ (teste-U de Mann-Whitney) e $p=0.1628$ para um alfa de 0.05(t-Student).

Tabela 13 ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE C3c DE 14 CONTROLES E 31 PACIENTES, QUE PARTICIPARAM DOS ENSAIOS DE QUIMIOTAXIA *IN VITRO*.

	Controles(mg/dL)	Pacientes(mg/dL)
média±EPM	85,12±5,2	73,95±4,7
mediana	83,44	68,5
P 25%	74,59	52,7
P 75%	103	100,5
		p=0.1412

EPM= Erro padrão da média, P= Percentis
p= Não significativo

O coeficiente de variação entre os *pacientes* foi de 35.52 e 23.01 nos *controles*. De 31 *pacientes* avaliados, 6/31 (19.3%) apresentavam níveis menores que 50 mg/dL, 10/31 (32.2%) com níveis acima de 90 mg/dL. Os restantes 15/31 (48.3%), com níveis dentro da faixa de normalidade conforme os valores de referência (50-90 mg/dL).

No grupo de *controles*, constituído de 14 doadores, nenhum apresentou níveis abaixo de 50 mg/dL: 6/14 (42.8%) tinham valores acima de 90 mg/dL e os restantes 8/14 (57.1%) mantinham níveis séricos dentro da média dos valores normais de referência (**Fig. 20**)

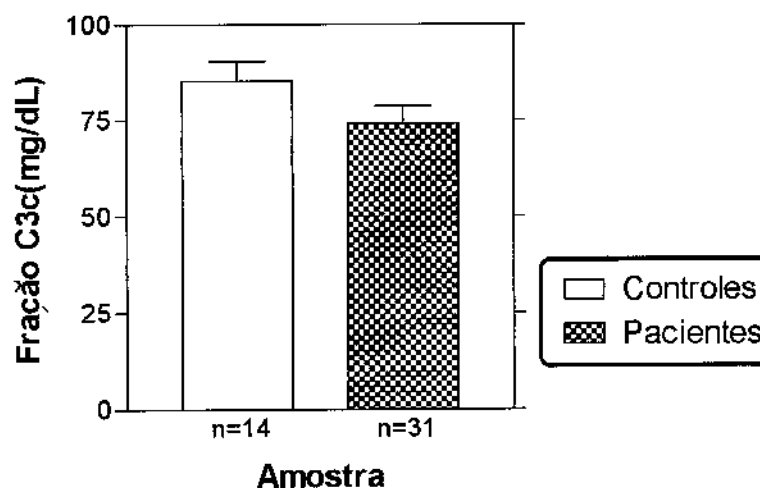


Fig. 19a Ilustra a relação das médias e o erro padrão da média dos níveis de C3c (mg/dL) na amostra estudada, que inclui 31 pacientes e 14 controle. Ambos os grupos, participaram dos ensaios de quimiotaxia *in vitro*, preconizados nos protocolos clínicos. Não se observou diferença significativa entre as médias.

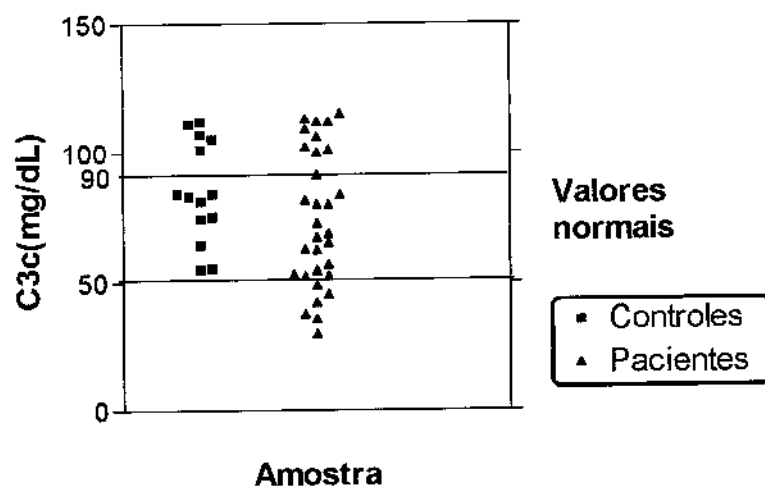


Fig. 19b Frequência de distribuição dos níveis séricos de C3c em 31 pacientes e 14 controles em relação aos valores normais.

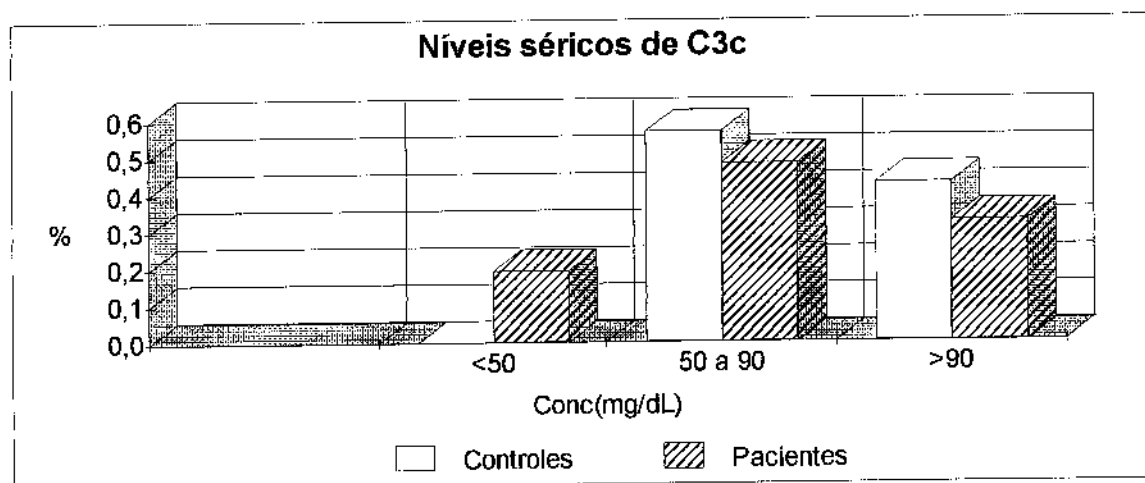


Fig. 20 Distribuição percentual dos níveis de C3c em controles e pacientes, conforme três faixas séricas. Níveis inferiores a 50 mg/dL ou maiores de 90 mg/dL, foram considerados patológicos. A faixa de normalidade utilizada neste ensaio, padroniza 50-90 mg/dL como o valor mais aceito.

NÍVEIS DE C₄ (Anexo 5)

A mesma análise foi aplicada para os valores de C₄ (**Fig. 21a**) em ambos os grupos, com o mesmo número de casos (31 *pacientes* e 14 *controles*). A **Fig. 21b** ilustra a frequência de distribuição de ambos os grupos em relação aos valores normais.

A hipótese de que os níveis séricos dos *pacientes* seriam menores que nos *controles* foi testada e confirmada na avaliação estatística, com *p=0.028 no teste-U de Mann-Whitney e *p=0.020 para um alfa de 0.05 com t=-2.416 (t-Student). A distribuição de ambos os grupos é gaussiana. (**Tabela 14**).

Tabela 14 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE C₄ DE CONTROLES E PACIENTES, QUE PARTICIPARAM DOS ENSAIOS DE QUIMIOTAXIA *IN VITRO*

	Controles(mg/dL)	Pacientes(mg/dL)
média±EPM	32,34±3,5	23,3±1,9
mediana	29,91	20,6
P 25%	23,62	16,2
P 75%	38,95	28,7
p		*p=0.028

EPM= Erro padrão da média, P= Percentis

*p= Estatisticamente significativo

Dentre os *pacientes*, 1 (3.2%) apresentou níveis menores que 10 mg/dL, 2 acima de 40 mg/dL (6.4%) e os restantes 28 (90.3%) com níveis dentro dos valores normais de referência de 10-40 mg/dL.

No grupo *controle*, com 14 doadores, não se detectou níveis abaixo de 10 mg/dL na amostra; 4 doadores apresentaram níveis maiores que 40 mg/dL e os 11 doadores restantes (78.5%) apresentavam níveis normais (Fig. 22).

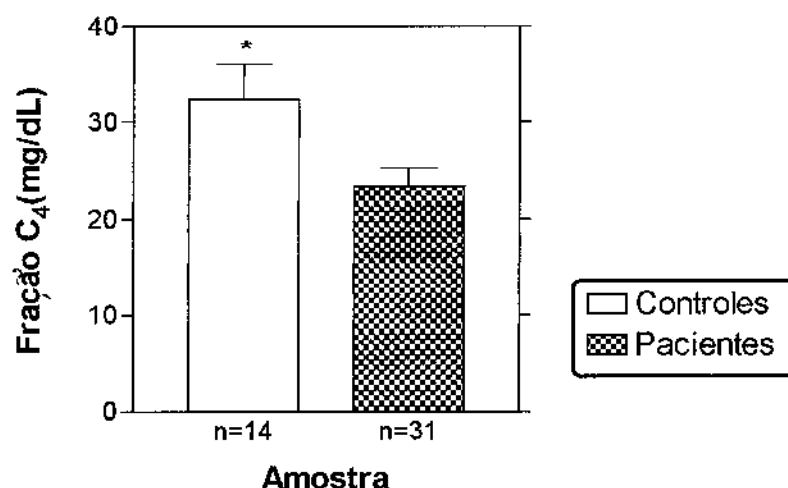


Fig. 21a Distribuição gráfica das médias e erro padrão da média, dos níveis séricos da fração C₄ de pacientes e controles. As amostras incluem indivíduos que participaram dos três protocolos clínicos nos ensaios de quimiotaxia. n= representa o número de indivíduos em cada grupo. *= Estatisticamente significativo.

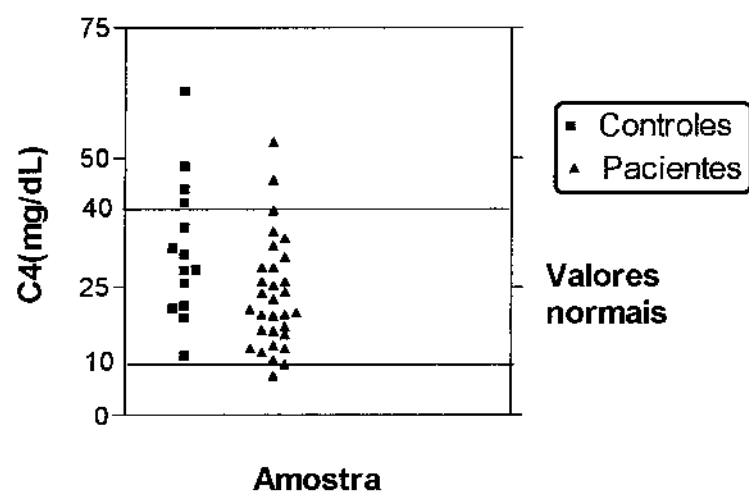


Fig. 21b Frequência de distribuição dos níveis séricos de C4 em 31 pacientes e 14 controles, em relação aos valores normais.

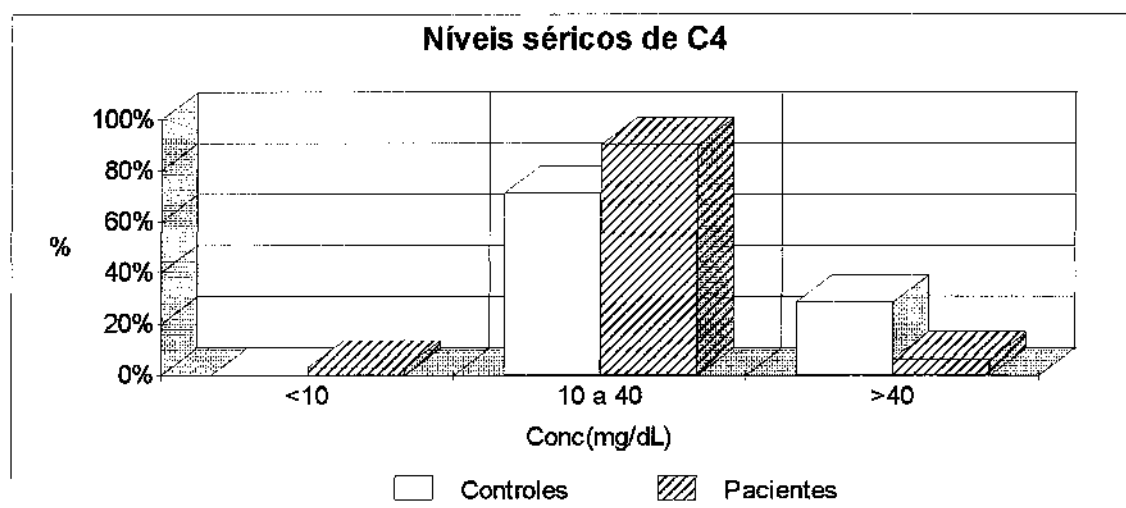


Fig. 22 Distribuição percentual das médias dos níveis de C₄ de controles e pacientes, em relação a três faixas séricas (mg/dL). Os valores compreendidos entre 10-40 mg/dL representam a normalidade.

MORTALIDADE

De um total de 33 pacientes envolvidos nesta pesquisa (incluindo os 3 **protocolos** clínicos), ocorreram 4 óbitos (12,1%), dos quais três eram crianças do sexo feminino (cujas idades eram, respectivamente 1 ano e 11 meses, 6 e 7 anos) e uma do sexo masculino, de 11 anos de idade, vítima de traumatismo cranioencefálico grave que evoluiu com morte cerebral. As doenças que causaram diretamente a morte das outras três crianças foram, meningite bacteriana (pneumococo), sépsis criptogenética, e septicemia por Haemophilus influenzae, um caso de cada enfermidade, respectivamente.

Três crianças apresentavam níveis de cortisol elevados. Duas apresentavam leucocitose com presença de formas jovens no leucograma, e, houve um caso de leucopenia. O ensaio de quimiotaxia *in vitro* foi normal em duas, houve reduzida migração em um caso (no qual o soro ativado era o da própria paciente), e não foi possível realizar o ensaio em outro, devido a leucopenia importante. A fração C3c foi normal em duas crianças; as restantes, uma com nível acima e outra abaixo, após testados, não foram estatisticamente significativos em relação a faixa de normalidade. Os 4 pacientes tinham níveis de C₄ normais. (**Tabela 15**).

Tabela 15 ANÁLISE DE 4 CASOS DE ÓBITO EM PACIENTES QUE PARTICIPARAM DOS ENSAIOS DE QUIMIOTAXIA *IN VITRO* E SUA CORRELAÇÃO COM CERTAS VARIÁVEIS CLÍNICO-LABORATORIAIS

	PACIENTES			
	1	2	3	4
Idade	6a	1a 11m	7a	11a
Sexo	F	F	F	M
Cortisol(μ g/dL)	29,8	33,3	21,6	24,8
C3c(mg/dL)	91,3	48,9	62,6	45,4
C4(mg/dL)	25,3	16,7	20,6	19,6
nº leucócitos/mL	3000	12500	8000	11400
SA paciente(c/c)	/	4,6	22	/
SA controle(c/c)	/	12,1	17	/
SNA paciente(c/c)	NR	/	/	4,1
SNA controle(c/c)	NR	/	/	3,3
Protocolo	piloto	A	A	piloto

SA= Soro ativado com LPS 10% SNA= Soro não incubado com LPS 10%

M= masculino, F= feminino, C/C= número de células por campo

NR= ensaio não realizado devido ao reduzido número de células

P= Protocolo ao que pertence

V. DISCUSSÃO

No presente estudo, no qual as condições de morbidade de cada paciente eram determinadas pelas doenças que ocasionaram a internação na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP), de fato extremamente variadas, observou-se que o sistema imune, mesmo em situações adversas, é capaz de responder, até satisfatoriamente, a um agente indutor de quimiotaxia. Não cabe aqui fazer qualquer extrapolação de situações, respostas ou inferências, frutos desse trabalho, como algo absoluto que acontece com o indivíduo *in vivo*, onde até a magnitude do agente indutor pode variar de forma muito ampla.

Subsistem ainda algumas dúvidas relativamente ao LPS e a sua interação com os neutrófilos. A gravidade de um paciente em estado crítico alteraria a sensibilidade de receptores de LPS na superfície dos neutrófilos? Haveria saturação de receptores de LPS após um certo período de incubação dos neutrófilos com o agente quimiotático e, a partir de um determinado momento, a reação tenderia a estacionar?. A ocupação de um número elevado de receptores de LPS, havendo saturação, poderia, de alguma forma, prejudicar a viabilidade dos neutrófilos?.

A frequência de admissões por faixa etária e sexo, encontrada na população estudada, não obedece rigorosamente a estatística de admissões da UTIP do HC-UNICAMP. A maioria dos pacientes da amostra tinham, em média, 4.1 ± 0.5 dias de internação na UTIP ao serem incluídos nos protocolos experimentais. Apesar desta unidade não ser o centro de referência para queimados na região, admitiu-se apenas um "grande queimado", com cerca de 35% de superfície corporal atingida.

O **protocolo** “piloto”, que inclusive, permitiu a implantação da técnica e da metodologia desta pesquisa, previa uma segunda e até uma terceira fase de avaliação da quimiotaxia *in vitro* em todos os sobreviventes participantes do estudo.

Posteriormente, a proposição inicial não se mostrou atraente, visto que não foram observadas diferenças significativas no grupo de pacientes estudados.

Tanto a segunda fase, em que os pacientes, tendo recebido alta da UTIP, vão para a enfermaria de Pediatria, lá permanecendo até retornarem para casa, como a terceira fase, de 3-6 meses após a primeira coleta, na qual os pacientes seriam convidados, exclusivamente na qualidade de doadores, para mais um experimento, não se concretizaram.

Uma série de fatores dificultou a efetivação do protocolo inicial, o qual precisou ser modificado, passando a se basear numa realidade mais compatível com a pesquisa, sem, entretanto, prejudicar a validade dos fatos discutidos a seguir.

Um fator que muito pesou na decisão de não implementar as duas últimas fases foi a procedência dos pacientes, em sua maioria de outras cidades ou estados. Ele teria dificultado completar, a rigor, cerca de 80% dos casos iniciais. Apenas 5 dentre 17 pacientes do **protocolo “A”** residiam em Campinas.

Há relatos na literatura que questionam as técnicas de separação de neutrófilos por gradientes em várias densidades. Isto porque as células poderiam sofrer alterações funcionais, diretamente provocadas pelo produto que utilizado.

As técnicas mais comumente aplicadas para esse fim são a do Ficoll-Hypaque com sedimentação pelo dextran, a de gradientes pelo Percoll e o método de resolução no meio Mono-poli (M-RPM).

Os três produtos utilizados são quimicamente indutores de pseudopódeo nos neutrófilos sendo, porém, o percoll que induz, significativamente, menor formação de pseudopódeo. A média fica em torno de 40% das células ($p < 0.05$). O Ficoll e o M-RPM atingem, em média, 57 e 63% das células, respectivamente (VENAILLE, J.T. *et al.*, 1994).

No presente estudo, utilizou-se o Ficoll-Hypaque com duplo gradiente em todos os protocolos.

A técnica utilizada para avaliar a migração de PMNs em microcâmara de quimiotaxia através de um sistema de filtro com microporos descrita por Zigmond *et al.*, (1973) tem sido bastante utilizada devido a sua praticidade e alta precisão.

Algumas dúvidas porém, têm sido levantadas quanto ao tipo de filtro empregado. Em estudos realizados *in vivo* a locomoção dos neutrófilos é fortemente influenciada pelo grau de aderência celular ao substrato (KELLER *et al.*, 1983; MARKS & MAXFIELD, 1990). Se a arquitetura do filtro oferecer muita resistência à célula, o resultado final poderá ser falso e inconclusivo, visto que a locomoção poderá ser lenta nessas circunstâncias.

Os neutrófilos se movimentam através do tecido conjuntivo *in vivo* utilizando prolongamentos do citoplasma que interagem, contornando as fibrilas de colágeno e outros obstáculos fixos do tecido. Para tal locomoção, o neutrófilo usa a mínima aderência possível, de tal forma que possa locomover-se interagindo com o substrato em 3 dimensões. A maioria dos estudos têm desconsiderado o fator aderência.

O princípio ativo do método é o de submeter uma população de neutrófilos em concentração estabelecida através de um gradiente positivo, diante de um estímulo indutor de quimiotaxia, interposto por um meio semi-sólido, uma matriz que representa o filtro, separando ambas as soluções. No filtro, as células tornam-se polarizadas, com orientação para a fonte indutora de quimiotaxia que está sendo utilizada (CATERINA & DEVREOTES., 1991).

No momento, um dos filtros que parece se adaptar melhor a este tipo de estudo é o filtro com gel de colágeno, composto de fibras dispostas em três dimensões, favorecendo o mínimo de atrito (SCHMALSTIEG *et al.*, 1986).

Entretanto, o filtro de nitrocelulose utilizado nesta pesquisa, com poros medindo 5 micras, continua sendo válido, desde que se obedeça as orientações estipuladas pelo fornecedor, tais como tempo de validade, conservação em temperatura ambiente, umidade, tempo de permanência do meio de cultura, etc. Os testes realizados por AZZARÀ, A. *et al.* (1995) recentemente publicados, confirmaram uma hipótese que por muito tempo carecia de confirmação. No processo de locomoção através do filtro, tanto quando se trata de migração espontânea como de estímulos quimiotáticos, a relação existente entre contagem de polimorfonucleares e profundidade percorrida no filtro, ambas estão definidas por uma curva de Gauss, isto é, com distribuição normal.

Os agentes quimiotáticos induzem rapidamente a uma elevação do conteúdo do filamento actina, no interior do neutrófilo, responsável por alterações morfológicas dinâmicas que não dependem do conteúdo total de F-actina como se acreditou por muito tempo, e sim da concentração do agente(EHRENGRUBER *et al.*, 1995).

O presente estudo demonstra *in vitro* que a *leucotaxia*, isto é, a movimentação unidirecional de polimorfonucleares (PMNs) em relação ao estímulo quimiotático que neles está sendo aplicado, está preservada mesmo em crianças com comprometimento sistêmico, gravemente enfermas.

No ensaio de quimiotaxia *in vitro* realizado com 18 *pacientes* e dez *controles* referidos no **protocolo "A"**, não se evidenciou diferença significativa quando se compara a média de migração (células/campo) entre os PMNs de *controles* e os de *pacientes*, ambos submetidos a um longo processo de preparo e incubação com LPS de *E. coli* a 10%. O índice de quimiotaxia, um indicador inespecífico da migração *in vitro*, mostrou a proximidade existente entre estes dois grupos. Provavelmente a concentração de LPS representou um forte estímulo para ambos, não sendo possível avaliar mais detalhadamente o início dessa resposta, a sua velocidade gradativa até atingir um pico máximo e a sua permanência no mesmo. Tanto os PMNs de *pacientes* quanto os de *controles* responderam rapidamente ao estímulo quimiotático.

A quimiotaxia de PMNs incubados em soros contendo LPS 10%, foi consideravelmente maior do que a migração espontânea (ME) no meio de cultura. Este aumento atingiu a ordem de 100% em relação aos valores obtidos no meio, indicando que o LPS foi capaz de gerar fatores quimiotáticos nos soros de *pacientes* e *controles*, com a mesma intensidade acionando a cascata de complemento com formação de frações. Estes resultados sugerem que há integridade do sistema do complemento.

Ao avaliar a ação do soro de *pacientes* sobre a quimiotaxia dos PMNs *controle*, a análise não paramétrica rejeitou a hipótese de haver diferenças significativas em relação aos PMNs de *pacientes*. Este resultado, entretanto, não se observa com a análise paramétrica, também aplicada, em função da normalidade de distribuição desses dois grupos, cujo valor foi significativo. Estes fatos sugerem que exista algum componente no soro de *pacientes*, capaz de inibir a quimiotaxia *in vitro* de PMNs de indivíduos sadios. A análise deste tipo de ensaio, utilizando-se vários períodos de incubação, provavelmente deva esclarecer esses achados.

A quimiotaxia de PMNs de *pacientes* incubados em soro de *controles* ativado, ao ser comparada com a quimiotaxia em seu próprio soro, não foi significativa. O efeito esperado era que no soro de *controles* esses PMNs migrassem mais. O fato pode também estar relacionado, com o tempo de incubação, como referido anteriormente.

Quando a quimiotaxia de PMNs de *pacientes* incubados em soro com LPS 10% ou não foi estudada, não se observou diferença significativa ($p=0.07$). Isto sugere que, de fato, já existe uma ativação intrínseca dos neutrófilos nesses indivíduos, onde independente do estímulo, ocorre migração. Em contrapartida, a diferença é extremamente significativa, ao se comparar a quimiotaxia de PMNs de *controles* e de *pacientes*, incubados em seus soros respectivos sem LPS. Esta diferença atinge mais de 100%. É como se existisse um *priming* nos PMNs de *pacientes*.

OPDAHL (1993), defende a existência de um *priming* secundário a processos infecciosos. Ele demonstrou em pacientes sépticos, a presença de agentes quimiotáticos plasmáticos circulantes, capazes de ativarem os polimorfonucleares, exacerbando, assim, a sua resposta diante de estímulos de quimiotaxia específicos.

A análise final da quimiotaxia *in vitro* do **protocolo “A”** se completa ao correlacionar migração de PMNs de *pacientes* com as faixas etárias e com o tipo de doenças. Em ambos os casos, não se observaram diferenças significativas. Por tanto, não é possível afirmar que os lactentes e crianças menores, que representam quase 50% da população estudada (1-5 anos), possuam neutrófilos com menor capacidade de locomoção, do que crianças acima dessa faixa etária. Mesmo no subgrupo de *pacientes* com patologias infecciosas, formado por 5 casos de septicemia, 80% destes tinham quimiotaxia acima da média. Poderia até existir um comportamento bimodal nessa população, porém em função do limitado número de casos, essa hipótese não pode ser confirmada.

O *paciente* com meningite bacteriana por *S. pneumoniae*, tinha níveis de quimiotaxia abaixo da normalidade, que visto isoladamente, é um dado totalmente inconclusivo.

SHIN et al.,(1968) utilizando porquinhos da Índia, *in vivo*, observou que em poucos minutos, o LPS foi capaz de ativar o sistema complemento, desencadeando o aparecimento súbito da atividade quimiotática.

Foi demonstrado que a via *alternativa* do complemento pode ser ativada por vários polissacárides, endotoxinas bacterianas (LPS), alguns fatores contidos em veneno de cobra e por componentes intracelulares expostos durante a lesão celular.

Há evidências de que *in vitro*, em condição ideal de temperatura (incubação a 37°C), a interação entre o complemento e outras proteínas plasmáticas é favorável, desde que o sistema do complemento esteja íntegro. As 2 vias são ativadas por um mecanismo que não utiliza anticorpos contra a molécula de LPS(MORRISON & KLINE, 1977).

Embora os resultados obtidos de C3c e C4 de *pacientes* estivessem dentro da faixa de normalidade, somente quando se comparou os níveis de C4 entre os dois grupos, *controles* e *pacientes*, é que se observou uma tendência para níveis mais baixos nos *pacientes*, sendo significativo com $*p < 0.028$ (t-Student).

É provável que essa tendência seja decorrente de um maior consumo de C4. Vale citar que 48.3% dos *pacientes* manteve níveis normais de C3c, 32% com níveis acima do normal e 20%, com valores abaixo. Esta variação ampla entre os *pacientes* faz supor que:

- Doenças agudas, na maioria auto-limitadas, não consomem *a priori*, abruptamente, os estoques de C3c ao ponto de serem significativamente alterados. Entretanto, há consenso na literatura de que exista, de fato, um aumento transitório do consumo em certas doenças agudas, com retorno lento e gradativo aos níveis basais.
- A agressão da doença poderia estimular a síntese protéica com maior formação de C3 até se atingir um ponto no qual não haveria mais clivagem, dependente em grande parte, da duração e da magnitude da agressão (infecção, trauma).
- O fato de ser detectada uma população com níveis menores aos de referência, representa apenas 19.3% dessa mesma população (6/31), pode ser considerado apenas uma variação dentro da população, já que existe bastante dispersão na amostra. Não se detectou clínica de hipocomplementenemia nesses 6 *pacientes* ou história de infecções recorrentes, sendo o menor nível detectado em torno de 30mg/dL, o que é um valor relativamente próximo ao normal, sem interesse clínico.

- Relativamente ao C4, é provável que, como acontece com pacientes com queimaduras extensas -com imediata ativação do complemento-, haja após uma primeira fase, uma depleção desses níveis que nos queimados persiste em torno de 10 dias ou mais, dependendo da extensão corporal queimada.

Neste estudo foi feita somente uma colheita de cada fração. Por isso não se pode traçar um perfil que caracterize a evolução sérica.

No caso do *único paciente queimado* incluído neste estudo, ele apresentava níveis subnormais da fração C3c. A fração C4, embora normal, estava próxima do nível inferior de normalidade.

Os resultados do C4 obtidos nesta casuística, foram também observados por GOYA *et al.* (1994) que não detectou qualquer decréscimo em onze pacientes estudados, portadores de insuficiência de múltiplos órgãos.

No ensaio de quimiotaxia, no qual PMNs de indivíduos sadios foram incubados com soro de *controles* e/ou de *pacientes* (**protocolo "B"**), observou-se um aumento progressivo da migração de PMNs até atingir-se a concentração a 3% de LPS, a partir da qual observa-se um declínio também gradativo e lento. Existe concordância entre os valores achados em ambos os grupos. Se o pico de migração máxima ocorreu na concentração a 3% de LPS, por quê em concentrações maiores não se obteve resposta, maior ou ao menos, semelhante?

Alguns fatos poderiam explicar a observação acima registrada:

- Presença de *receptores* na superfície dos neutrófilos?

Atualmente existe consenso na literatura de que na superfície de neutrófilos há uma diversidade de estruturas que favorecem o contato célula-célula. Estas estruturas, hoje denominadas moléculas de adesão, são responsáveis pelo reconhecimento e ligação à outras células, a componentes extracelulares ou mesmo a superfícies sintéticas, já que essas estruturas estão ligadas ao citoesqueleto celular através de prolongamentos citoplasmáticos e comportam-se como intermediários de um diálogo em ambas as direções através da membrana celular.

Embora inicialmente tenha-se usado os termos "receptores de adesão" referindo-se às moléculas de adesão, hoje apenas se aceita esse último, que inclui outras classes bioquímicas como as integrinas, imunoglobulinas, selectinas, fosfolípidos e carboidratos, cuja discussão foge aos propósitos dessa abordagem. Apenas citamos o papel das integrinas para enfatizar a participação da molécula de adesão MAC-1, antigamente conhecida como receptor de complemento 3 ou CR3 que, inclusive, é a que permite ao neutrófilo ligar-se à endotoxina, LPS de *E. coli* (RAMPART, 1994).

É provável que em concentrações crescentes, os locais de ligação vão se esgotando, ao ponto de se estabelecer uma condição de saturação. Entretanto, persiste certa atividade migratória, o neutrófilo ainda sofre locomoção, e em nenhum momento observou-se abolição total de sua motilidade. O movimento dos polimorfonucleares é dose-dependente e pode inibir-se quando o agente quimiotático se encontra em altas concentrações (WILKINSON & HASTON, 1988; GONZÁLEZ *et al.*, 1995).

Não há evidências de que havendo saturação desses locais, implique em perda da função leucocitária, com diminuição na capacidade fagocitária, liberação de enzimas líticas e outras funções inerentes ao neutrófilo (CREAMER *et al.*, 1991). Por outro lado, como acontece na fibrose cística em que o número de receptores para LPS permanece inalterado, até que ponto isto também é válido para pacientes com outras doenças sistêmicas graves? A análise feita por DAI *et al.* (1994), com 18 pacientes e 13 controles, analisa *in vitro* a lentidão da resposta migratória de neutrófilos em pacientes com fibrose cística. Os agentes quimiotáticos utilizados foram a interleucina (IL-8) e o formil-metionil-leucil-fenilalanina (f-MLP). Foi constatado que havia diminuição da locomoção do neutrófilo exclusivamente à IL-8, inclusive com redução do número de receptores para IL-8, em relação aos controles. Na fibrose cística confirmou-se que há níveis circulantes constantemente elevados de IL-8 nesses pacientes, gerando um mecanismo que inibe a regulação, até da própria expressão do receptor na superfície do neutrófilo ("down-regulation"), ao qual se atribui a menor resposta migratória.

•Déficit na *capacidade de ligação* do neutrófilo a nível de receptor para LPS?

O local onde ocorre esta ligação é ao nível do lipídio A na molécula de LPS. É bem provável que condições externas à célula, possam aumentar o consumo de oxigênio intracelular, esgotar as reservas energéticas na forma de glicose, devido ao estado de catabolismo celular, e inibir a ligação neutrófilo-lipídio A. Um exemplo dessas condições externas é o caso de uma infecção localizada que se torna sistêmica com comprometimento de múltiplos órgãos. A partir dessa visão levanta-se a hipótese de uma perda de afinidade desse complexo, caracterizada por "dessensibilização" a nível de receptor para LPS, podendo ser reversível ou não, dependendo da resposta do hospedeiro à injúria.

Supõe-se que ao reduzir a afinidade, atenua-se a resposta do neutrófilo ao estímulo quimiotático, até atingir a concentração de 10%.

• *Inibição da migração por componentes do soro do paciente?*

A presença de substâncias que inibem a migração de PMNs, foi confirmada em várias situações em humanos e animais experimentais. É o caso de pacientes com queimaduras extensas (WARDEN *et al.*, 1974; SANNOMIYA, P., 1992), diabéticos (SANNOMIYA, P.; PEREIRA, M.A.A. & GARCIA-LEME, J., 1990), idade avançada (MELLO, S.B.V. *et al.*, 1992), imunodeprimidos, etc. Tratando-se de uma substância inibidora, perguntaríamos sobre sua natureza. Teria ou não efeito reversível ao se realizar uma segunda incubação, e se após lavagem das células incubadas em soro de *pacientes*, essas mesmas células fossem reincubadas, com o soro de *controles*?

No **protocolo “B”** demonstrou-se que o soro de *pacientes* inibe a migração de PMNs de indivíduos sadios, significativamente, ao ser comparada com a incubação desses mesmos neutrófilos em soro de *controles*. Não foi possível verificar se o efeito é ou não reversível. A recuperação de neutrófilos de *controles* após terem sido incubados no soro de *pacientes* e lavados no meio de cultura (ME), tendem a cair quando se faz uma segunda incubação, seguida de uma última lavagem. Em função da baixa celularidade observada, torna-se impossível alcançar a concentração padrão utilizada neste estudo, da ordem de 4×10^6 células/mL.

É possível que tenha havido aderência dos PMNs às paredes do tubo. Talvez seja recomendável trabalhar com maior volume de soro, da ordem de 30-50 mL para se obter uma recuperação maior de células e verificar se a inibição é reversível ou não. SANNOMIYA (1992), trabalhando com plasma humano, verificou também que neutrófilos sadios pré-incubados com plasma de

pacientes migravam menos que os incubados em soro de *controles* (* $p < 0.001$). Essas descobertas foram válidas em pacientes com queimaduras extensas, após o terceiro dia de internação e também em ratos diabéticos. Convém ressaltar aqui que, além da inibição gerada por componentes do plasma de pacientes, existe no queimado um componente imunológico deficitário que se sobrepõe (DEITCH & McDONALD, 1982; BRAQUET *et al.*, 1985).

Nos diabéticos o "fator inibidor" é termo-lábil, destruído pela tripsina e separado por diálise parecendo interagir com o receptor C_{5a} na superfície do neutrófilo (SANNOMIYA, PEREIRA, GARCIA LEME, 1990).

O fator "estresse", resultante das condições em que o paciente está submetido numa UTIP, talvez seja o denominador comum para todos os pacientes admitidos neste estudo.

Alguns parâmetros, inclusive variáveis endócrinas, têm sido propostos em diversos trabalhos, até para fins de prognóstico de mortalidade em pacientes críticos.

Neste estudo observou-se níveis de cortisol sérico mais elevados nos *pacientes*, sendo 52% destes, com níveis acima de $20\mu\text{g/dL}$, enquanto apenas 2 *pacientes* (7.4%) apresentaram níveis abaixo de $5.5\mu\text{g/dL}$. Um dos *pacientes* encontrava-se em pós-operatório de glioma de tecto mesencefálico associada a hidrocefalia, o outro era vítima de traumatismo cranioencefálico grave com hipertensão intracraniana. Ambos estavam sob uso de dexametasona na dose de 0.5mg/Kg/dia . Apenas 40.7% (11/27) dos *pacientes* tinham níveis normais. Por outro lado, a dosagem de cortisol de 16 *controles* demonstrou que 94% (15/16) dos indivíduos tinham níveis normais ($5.5\text{--}20\mu\text{g/dL}$), nenhum com níveis abaixo de $5.5\mu\text{g/dL}$ e apenas 1 indivíduo (6%) com níveis elevados acima de $20\mu\text{g/dL}$. O horário da coleta, conservação do material, kit utilizado e método de dosagem entre *pacientes* e *controles* foi o mesmo.

Os dados confirmam as descobertas de JAREK *et al.*(1993), que também detectou, em humanos, elevação dos níveis de cortisol em adultos, internados em Unidade de Terapia Intensiva, onde no 2º dia de internação, havia elevação significativa dos níveis de cortisol quando comparados com valores normais de referência. Esses autores ainda conseguiram correlacionar um maior número de óbitos com os pacientes que tinham níveis de cortisol sérico mais elevados. COIMBRA *et al.*(1992), em experiência com ratos parcialmente hepatectomizados, verificou elevação dos níveis de corticosterona circulante, eosinopenia, leucocitose e redução da capacidade de resposta inflamatória, com recuperação total por volta do 20º dia de pós-operatório.

Diversos trabalhos demonstram que a administração de glicocorticóides inibe a mobilização de neutrófilos na inflamação (FARSKY *et al.*,1995, SCHLEIMER *et al.*, 1989). CUNHA & FERREIRA (1986) observaram que animais previamente tratados com dexametasona, apresentavam diminuição importante do número de neutrófilos no local da inflamação (cavidade peritoneal) e inibiam a liberação de um fator quimiotático liberado por macrófagos previamente estimulados com LPS de *E. coli*. O bloqueio da ação de outras citocinas, como a IL-8, com comprovada ação quimiotática, também foi observado com o uso de glicocorticóides, que parecem agir indiretamente bloqueando a liberação de substâncias quimiotáticas liberadas pelas células residentes (RIBEIRO *et al.*, 1991).

Há evidências de que a locomoção de neutrófilos permanece inalterada quando as células entram em contato direto com corticosteróides. Porém, observa-se menor acúmulo delas na área da inflamação, provavelmente por um mecanismo indireto, através do bloqueio na produção de eicosanóides, particularmente das citocinas, envolvidas no processo de recrutamento. (KNUDSEN *et al.*,1987; BOCHNER *et al.*, 1987; DINARELLO *et al.*, 1989; FACCIOLI *et al.*, 1990).

A experiência de MITCHELSON *et al.* (1994), estudando as alterações endócrinas de pacientes com doenças agudas graves, observou que em altas concentrações do hormônio cortisol, os receptores ocupados são os de tipo II ou também chamados de clássicos. Em baixas concentrações, os tipo I (ou receptores de mineralocorticóides) são acionados tendo, inclusive, alta afinidade com o cortisol. Discute-se ainda por que em altas concentrações de cortisol, onde deveria haver supressão total do eixo hipotálamo-hipofisário, ainda pode existir ativação do mesmo. Ao que parece, o mais provável é que, ao invés da indução do hormônio liberador de corticotropina (CRH) acionar a secreção do ACTH na hipófise, haveria secreção de ACTH por uma outra via, por indução via arginina-vasopressina que não são substâncias sujeitas ao "feed-back" cortisol-dependente.

Em ratos (C₅₇/B) submetidos a ruído (100 db) diário, a partir de meia noite durante 5 segundos em cada minuto por 1 a 3 horas contínuas, apresentavam níveis de cortisol persistentemente elevados até o 10º dia. Após o qual se observava uma queda gradual, tendendo aos níveis basais. No pico de elevação máxima ocorria uma depressão da resposta imune, com redução da linfocitotoxicidade e diminuição global do número de células nucleadas a nível de baço (MONJAN & COLLECTOR, 1977).

No presente estudo foi realizada uma única dosagem de cortisol, à exceção de um paciente do qual a segunda amostra, coletada treze dias após a primeira, observou-se uma queda dos níveis séricos em torno de 30% do valor inicial (de 13µg/dL para 9.5µg/dL). É possível que ocorra uma redução, através de um mecanismo que pode estar sendo mediado por outra via diferente da hipotálamo-hipofisária (MITCHELSON *et al.*, 1994).

Em crianças gravemente enfermas esse mecanismo, somente poderia ser confirmado através da confecção de uma curva com repetidas dosagens em uma população, representando os níveis de cortisol em função dos dias de evolução da doença. Entretanto, ainda existe a possibilidade de que a liberação do cortisol endógeno seja dependente do “estresse”. Isto significa que, conforme vai ocorrendo a recuperação clínica do paciente, haverá uma tendência à diminuição espontânea. Em vista da heterogeneidade de doenças entre a população estudada, a redução do cortisol pode variar amplamente.

Foi possível demonstrar na casuística em foco, que os níveis elevados de cortisol em crianças graves não influenciam a resposta quimiotática dos PMNs. Em três dos quatro óbitos relatados foi possível determinar a quimiotaxia, sendo normal em um *paciente* e inferior ao normal, em dois. No entanto, amostras maiores serão necessárias para poder correlacionar mortalidade com quimiotaxia.

Não havia relato entre os pacientes que evoluíram a óbito de terem sido submetidos a transfusão recente com plasma congelado fresco (nas 24 horas prévias à coleta) ou história de imunodeficiências. A transfusão com plasma nesse período, poderia modificar a resposta quimiotática, devido a um *clearance* relativo de fatores inibidores plasmáticos do próprio enfermo. Apenas 2 *pacientes* tinham sido transfundidos com plasma humano nas 24 horas anteriores. Um deles com migração abaixo do normal e outro, acima da normalidade. O soro deste último *paciente*, ao ser incubado com os PMNs do *controle*, foi capaz de inibir a locomoção destes.

Trabalhos em pacientes com queimaduras extensas, analisando-se o *clearance* plasmático decorrente de transfusões a que esses indivíduos foram submetidos, constataram *in vitro* que ao se adicionar 80% de plasma humano

do queimado a 20% de plasma humano normal, ocorre uma reversão parcial do efeito inibitório ao pré-incubar neutrófilos de doadores-controles. Este fenômeno, porém, não se observa quando a transfusão é feita com concentrado de hemácias (BJORNSEN *et al.*, 1980). Efeito semelhante observou-se em um caso descrito de um portador da Síndrome de hiperimmunoglobulina E, que sendo submetido a plasmaferese apresentou melhora transitória da resposta quimiotática, sugerindo que tenha havido retirada parcial do fator inibidor sérico desse paciente (YAMADA *et al.*, 1995).

A contagem absoluta de leucócitos em *pacientes*, dosados também uma única vez, mostrou níveis superiores aos encontrados em *controles*. Certamente, a leucocitose corria paralelamente à fase aguda da doença, no exato momento em que a ruptura da homeostasia estava prestes a atingir sua pior fase. A elevação conjunta dos níveis de cortisol e do número absoluto de leucócitos observada neste estudo também foi demonstrada em revisões de literatura (PARRILLO & FAUCI, 1979; WILLIAMS *et al.*, 1990).

VI. CONCLUSÕES

Casuísticas maiores às selecionadas no presente estudo, provavelmente, permitiriam organizar conclusões, referentes à quimiotaxia de polimorfonucleares *in vitro*, numa população mais homogênea. Entretanto, as observações encontradas, com base nas análises estatísticas, sugerem que:

A quimiotaxia *in vitro* de polimorfonucleares de crianças portadoras de patologias agudas graves, infecciosas ou não, provavelmente está preservada.

Os polimorfonucleares de *pacientes*, mesmo em soro não incubado com LPS a 10%, são capazes de se locomoverem tão bem quanto o neutrófilo que foi ativado pelo soro incubado com LPS.

Provavelmente existam componentes no soro de *pacientes*, capazes de exercerem um efeito inibitório sobre os polimorfonucleares de indivíduos sadios.

As variáveis aqui estudadas, níveis de cortisol, frações C3c e C4 e leucócitos totais, se comportam como variáveis totalmente independentes da quimiotaxia.

A elevação dos níveis de cortisol séricos entre os *pacientes*, caracterizou as condições de estresse a que estavam submetidos mostrando também, que existe uma dependência significativa entre níveis elevados e presença de doença.

PERSPECTIVAS FUTURAS

PROTOCOLO “A”

- Selecionar um maior número de pacientes, com patologias definidas, para caracterizar a migração referente a uma patologia ou a um grupo específico.
- Avaliar a liberação de ânions superóxidos correlacionando-a com a migração nos *pacientes*. Há relatos onde a incubação de polimorfonucleares com LPS, mesmo em baixas concentrações, de 0.01 µg/mL, resultou em aumento da liberação de ânions superóxidos em resposta ao estímulo com n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP), HASLETT, *et al.*(1985).
- Avaliar a ação do óxido nítrico como mediador e indutor de quimiotaxia e de outros agentes quimiotáticos.
BEAUVAIS, *et al.*(1995), trabalhando com sangue humano, verificaram o efeito do óxido nítrico exógeno como indutor de quimiotaxia em neutrófilos *in vitro*. Estes resultados sugerem que no indivíduo *in vivo*, provavelmente, o mesmo fenômeno seja observado.
- Estudar a função fagocitária de neutrófilos de pacientes, comparativamente com indivíduos normais.

PROTOCOLO “B”

- Avaliar se o efeito inibidor observado no soro de *pacientes* é reversível ou irreversível.
- Testar nos estudos de inibição dos soros, se os PMNs de *pacientes*, nas mesmas circunstâncias dos *controles*, sofrem a ação inibitória do próprio soro do *paciente*; assim sendo, aplicar o item anterior.
- Verificar o efeito inibitório do soro de *pacientes* sobre os PMNs vs. tempo (min) de incubação, avaliando se existe alguma correlação que possa ser atribuída à permanência em contato com o soro.

VII. RESUMO

RESUMO

O propósito deste estudo foi de avaliar a quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) *in vitro* em crianças graves, internadas em uma Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica.

Organizamos o estudo em três fases: uma fase inicial, composta por 8 *pacientes* e 8 *controles*, na qual implantamos a metodologia a ser seguida; a segunda, referida como **protocolo "A"**, constituída de 18 *pacientes* e 10 *controles*, onde comparamos a quimiotaxia por grupos diante do agente indutor de quimiotaxia, *E. coli* (100µg/mL) e a terceira, o **protocolo "B"**, com 7 *pacientes* e 6 *controles* onde se avalia a existência de fatores inibidores no soro de *pacientes* (SP).

A coleta de amostras em todos os protocolos ocorreu no mesmo horário. O isolamento dos PMNs foi baseado na técnica de separação por gradientes com dupla densidade (1119 e 1077). Cinco mililitros de sangue periférico foram acrescentados à coluna de gradientes em tubos limpos e centrifugados a 500 x g durante 30 min a 25°C. Feita a separação de células, estas eram lavadas, ressuspendidas 2 vezes numa solução tampão, e a seguir contadas na câmara de Neubauer para serem suspendidas novamente (4×10^6 células/mL). A solução tampão com pH 7.2, contendo 0.1 g% albumina, HEPES e o meio mínimo essencial de Eagle foi utilizada para a lavagem das células. Na fase inicial trabalhamos exclusivamente com soros não tratados. A incubação foi realizada em uma microcâmara de 48 poços, composta de dois compartimentos, separadas por um filtro de nitrocelulose de 5 micra. Em cima, no nível superior foram colocados 50µL de células de *pacientes* e *controles*, e no inferior 27µL do tampão e dos soros respectivos. Após 60 minutos de incubação a 37°C, em atmosfera umidificada com 5% CO₂ a microcâmara foi retirada, o filtro corado e em seguida fixado em lâmina de microscopia, estando apto para ser realizada a leitura.

No **protocolo "A"**, a pré-incubação foi feita com soros ativados com lipopolissacáride de *E. coli*, ao invés de soros não tratados.

No **protocolo “B”** foram isolados somente os PMNs de *controles*, conforme a técnica referida anteriormente. Essas células foram incubadas em soros puros, sendo utilizado o mesmo agente indutor de quimiotaxia, porém em 3 concentrações diferentes e a solução tampão foi o indicador da migração espontânea.

Alíquotas de soro de *pacientes* e *controles* foram estocadas para dosagem do cortisol e das frações C3c e C4 do complemento sérico. Níveis elevados de cortisol foram observados entre os *pacientes* (* $p < 0.01$), não existindo porém, correlação com a quimiotaxia dos PMNs. As frações de C3c e C4 do complemento foram normais entre os *pacientes*, porém o C4 foi significativamente menor nos *pacientes* do que nos *controles* (* $p < 0.05$). Vinte por cento dos *pacientes* apresentaram níveis de C3c inferiores ao normal. A contagem de leucócitos foi maior nos *pacientes* que nos *controles*, sem correlação com a atividade migratória (* $p < 0.05$).

O **protocolo “A”** sugere que a quimiotaxia de crianças graves, tanto de patologias infecciosas quanto de não infecciosas está preservada, não sendo detectadas diferenças significativas entre *controles* e *pacientes*.

O **protocolo “B”** sugere que exista algum “fator” no soro de *pacientes*, capaz de reduzir a locomoção de neutrófilos de indivíduos saudáveis.

Estudos posteriores e maiores casuísticas, certamente serão de extrema utilidade para caracterizar melhor os fenômenos observados *in vitro* e sua correlação com modelos *in vivo* em crianças graves.

VIII. SUMMARY

SUMMARY

This study examined the *in vitro* chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) obtained from critical care children admitted to a pediatric intensive care unit. The investigation was carried out in three stages. In the first, cells from eight patients and eight healthy volunteers were used to standardize the conditions for the chemotaxis assay. For this experiment, only non-activated sera from both the patients and the controls were used. In the second stage (Protocol A), the migration of PMNs from 17 patients and ten healthy individuals in response to *E. coli* lipopolysaccharide (100µg/mL) was studied, and in the third and final stage (Protocol B), the presence of chemotaxis inhibitors in the sera of seven patients was determined. For this, PMNs from 6 selected donors were incubated with sera from patients and healthy individuals in the presence of a chemo-attractant (*E. coli* lipopolysaccharide, 10µg/mL, 30µg/mL and 100µg/mL). Blood sampling for the determination of white blood cell counts and for the quantification of cortisol, C3c and C4 complement fraction levels were obtained from most patients and healthy individuals. In all cases, the blood samples were collected at the same time of day. PMNs were isolated using a double discontinuous Ficoll-Histopaque gradient and then washed twice in 5 mL of a balanced salt solution containing Eagles minimum essential medium, HEPES (0.85g%) and albumin (0.1g%), pH 7.2 (adjusted with NaOH). The cells were centrifuged at 400 g for 10 min at room temperature between washes and then re-suspended to a concentration of 4×10^6 /mL prior to use. The viability of these cells was >90% as determined by vital staining with Turk's solution. Chemotaxis was studied using a 48-well micro-chemotaxis chamber. The bottom chamber of each well contained 25µL of the desired chemo-attractant or serum while the upper chamber contained 50µL of the appropriate PMN suspension. PMN migration was allowed to proceed for 1 hr at 37°C in humidified air containing 5% CO₂. At the end of this period, the chambers were disassembled and the filter removed, stained, and the number of migrating cells counted.

There was no significant difference in the migration of neutrophils obtained from patients and normal individuals in Protocol A (14.0 ± 2.1 vs 11.2 ± 1.0 , respectively, counted in ten high power fields).

Protocol B showed that the sera of most patients contained a factor(s) capable of significantly ($p < 0.05$) inhibiting the migration of PMNs from healthy donors. The effect of this inhibitor sera factor(s) was definitely significant ($p < 0.05$), being observed in all the concentrations of LPS mentioned above. The cortisol levels in the patients ($20.6 \pm 1.7 \mu\text{g/dL}$), including the three stages, were significantly ($p < 0.05$) greater than in healthy donors ($13.16 \pm 1.7 \mu\text{g/dL}$) but did not correlate with the ability of inhibit migration. Likewise, whole leukocyte counts were also higher in patients (9270 ± 2470) than in donors (4400 ± 253). The C3c and C4 complement levels were generally normal in most of the patients, but 20%(6/31) had C3c levels under normality. No significant differences were observed between patients and donors C3c levels. On the other side, although both groups had C4 normal levels, the patients levels ($23.37 \pm 1.9 \text{mg/dL}$) were significantly ($p < 0.05$) lower than in donors ($32.34 \pm 3.5 \text{mg/dL}$).

Based on the above results, we conclude that the ability of PMN from critical care children to migrate following stimulation is unimpaired but that sera from these individuals contain a factor(s) capable of inhibiting the migration of PMN from normal donors. Hormonal levels, white blood cell counts and complement fraction levels failed to correlate with PMN migration.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS(ABNT) - Referências Bibliográficas. **NB-66**., 1978.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS(ABNT) - Referências Bibliográficas. **NBR-6023**., Agosto, 1989.

AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS/SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE CONSENSUS CONFERENCE: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Crit Care Med** ., **20**: 864-874, 1992.

AZZARÀ, A.; CHIMENTI, M.; CARULLI, G.; RIZZUTI-GULLACI, A. & AMBROGI, F. - An image processing procedure for the assessment of normality curves of motility of human granulocytes in micropore filters. **Scand J Clin Lab Invest.**, **55**: 399-408, 1995.

BEAUVAIS, F.; MICHEL, L. & DUBERTRET, L. - Exogenous Nitric Oxide elicits chemotaxis of neutrophils *In Vitro*. **J. Cell Physiol.**, **165(3)**: 610-614, 1995.

BHATTACHARYYA, G.K. & JOHNSON, R.A. In: **Statistical concepts and methods**. John Wiley & Sons, Inc., New York. Chapter 15, p: 505-549, 1977.

BJORNSON, B.; BJORNSON, H.S. & ALTEMEIER, WA. - Serum mediated inhibition of polymorphonuclear leukocyte function following burn injury. **Ann. Surg.**, **194**: 568-575, 1981.

- BOCHNER, G.S.; RUTLEDGE, B.K.; SCHLEIMER, R.P. - Interleukin 1 production by human lung tissue. II. Inhibition by anti-inflammatory steroids. **J. Immunol.**, **139**: 2303-2307, 1987.
- BOYDEN, S.V. - The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. **J Exp Med.**, **115**: 453-466, 1962.
- BRAQUET, M.; LAVAUD, P.; DUCOUSSO, R.; TRENQUE, T.; N'GUYEN, J.; GUILBAUD, J.; BRAQUET, P. - The cellular immune response in thermal injured patients. **Agents and Actions.**, **17**: 385-387, 1985.
- CALICH, V.L. & VAZ, C.A. In: **Imunologia Básica**. Livraria editora Artes Médicas Limitada, Cap. 1, p: 1-10, 1989.
- CATERINA, M.J. & DEVREOTES, P.N. - Molecular insights into eukaryotic chemotaxis. **FASEB J.**, **5**: 3078-3085, 1991.
- COIMBRA, R.; SANNOMIYA, P.; RASSLAN, S. & GARCIA-LEME, J. - Partial liver resection and Inflammation: role of endogenous glucocorticoids. **Inflammopharmacology.**, **1**: 213-222, 1992.
- CONDINO NETO, A.; VILELA, M.M.S.; CAMBIUCCI, E.C.; RIBEIRO, J.D.; GUGLIELMI, A.A.G.; MAGNA, L.A. & DE NUCCI, G. - Theophiline therapy inhibits neutrophil and mononuclear cell chemotaxis from asthmatic children. **Br J Clin Pharmacol.**, **32**: 557-561, 1991.

- CREAMER, H.R.; HUNTER, N.; BULLOCK, W.W.; GABLER, W.L. - Concurrent Lipopolysaccharide enhances chemotactic response of human polymorphonuclear leukocytes to bacterial chemotaxin. **Inflammation.**, **15**: 201-211, 1991.
- DAI, Y.; DEAN T.P.; CHURCH, M.K.; WARNER, J.O. & SHUTE, J.K. - Desensitisation of neutrophil responses by systemic interleukin 8 in cystic fibrosis. **Thorax.**, **49**: 867-871, 1994.
- DEITCH, E.A. & McDONALD, J.C. - Influence of serum on impaired neutrophil chemotaxis after thermal injury. **J Surg Res.**, **33**: 251-257, 1982.
- DE LACERDA, L.; KOWARSKI, A.; MIGEON, C.J. - **J Clin Endocr Metab.**, **36**: 1043, 1973.
- DINARELLO, C.A.; ENDRES, S. - Role of interleukin-1 in the pathogenesis of hypertensive diseases. **J. Cell Biochem.**, **39**: 229-238, 1989.
- EHRENGRUBER, M.U.; COATES, T.D. & DERANLEAU D.A. - Shape oscillations: a fundamental response of human neutrophils stimulated by chemotactic peptides? **FEBS Letters.**, **359**: 229-232, 1995.
- FACCIOLI, L.H.; SOUZA, G.E.P.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S. & FERREIRA, S.H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "*in vivo*" by indirect mechanisms. **Agents and Actions.**, **30**: 344-349, 1990.

- FALK, W.; GOODWIN Jr, R.H.; LEONARD, J.E. - A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. **J Immunol Methods.**, **33**: 239-247, 1980.
- FERRANTE, A. & THONG, Y.H. - Separation of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the one-step hypaque-ficoll method is dependent on blood column height. **J Immunol Methods.**, **48**: 81-85, 1982.
- GIELGEL, J.L; BROTHERTON, M.M.; CRONIN, P.; **Clin Chem.**, **28**: 1894, 1982.
- GIROIR, B.P. - Mediators of septic shock: New approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade. **Crit Care Med.**, **21**: 780-789, 1993.
- GONZÁLEZ, N.C.; CUETO, S.M.C.; PRECIADO, J.I.S. - Efecto *in vitro* del extracto bacteriano de *S. aureus* en la quimiocinesis y quimiotaxis de células polimorfonucleares. **Rev Alerg Mex.**, **42**: 9-13, 1995.
- GOYA, T.; MORISAKI, T. & TORISU, M. - Immunologic assessment of host defense impairment in patients with septic multiple organ failure: Relationship between complement activation and changes in neutrophil function. **Surgery.**, **115**: 145-155, 1994.
- GROGAN, J.B. - Suppressed *in vitro* chemotaxis of burn neutrophils. **J Trauma.**, **16**: 985-988, 1976.

- HADDOX, J.L. & PFISTER, R.R. - Evaluation of the methodology of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis. **J Immunol Methods.**, **163**: 273-273, 1993.
- HASÇELİK, G.; SENER, B. & HASÇELİK, Z. - Effect of some anti-inflammatory drugs on human neutrophil chemotaxis. **J Int Med Res.**, **22**: 100-106, 1994.
- HASLETT, C.; GUTHRIE, L.A.; KIPANIAK, J.M.; JOHNSTON, R.B. & HENSON, P.M. - Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. **Am J Pathol.**, **119**: 101-110, 1985.
- HESTON, P.M. & JOHNSON, R.B. - Tissue injury in inflammation: oxidants, proteinases and cationic proteins. **J Clin Invest.**, **79**: 669-674, 1987.
- HEWETT, J.A. & ROTH, R.A. - Hepatic and Extrahepatic Pathobiology of Bacterial Lipopolysaccharides. **Pharmacol Reviews.**, **45**: 381-411, 1993.
- JAREK, M.J.; LEGARE, J.E.; McDERMOTT, M.T.; MERENICH, J.A.; KILLEF, H.M. - Endocrine profiles for outcome prediction from the intensive care unit. **Crit Care Med.**, **21**: 543-550, 1993.
- KELLER, H. - Klinisch-Chemische Laboridagnostik für die Praxis, 91-148, Thieme Verlag, Stuttgart (1986).

- KELLER, H.U.; ZIMMERMAN, A.; COTTIER, H. - Crawling-like movements adhesion, to solid substrata and chemokinesis of neutrophil granulocytes. **J Cell Sci.**, **64**: 89, 1983.
- KLEIN, A.; CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. - The role of lymphocytes in the neutrophil migration induced by ovalbumin in immunized rats. **Immunology.**, **84**: 577-584, 1995.
- KNAUS, W.A.; ZIMMERMAN, J.E.; WAGNER, D.P.; DRAPER, E.A.; LAWRENCE, D.E. - APACHE-Acute physiology and chronic health evaluation: A physiologically based classification system. **Crit Care Med.**, **12**: 376, 1984
- KNUDSEN, P.J.; DINARELLO, C.A.; STROM, T.B. - Glucocorticoids inhibit transcriptional and post-transcriptional expression of interleukin 1 in U937 cells. **J. Immunol.**, **139**: 4129-4134, 1987.
- LEHRER, R.L.; GANZ, T.; SELSTED, M.E.; BABIOR, B.M. & CURNUTTE, J.T. - Neutrophils and Host defence. **Ann Int Med.**, **109**: 127, 1988.
- MALECH, H.L. & GALLIN, J.I. - Current Concepts:Neutrophils in human disease. **N Eng J Med.**, **317**: 687-694, 1987.
- MANTOVANI, A.; BUSSDINO, F.; DAJANA, E. - Cytokine regulation of endothelial cell function. **FASEB J.**, **6**: 2591, 1992.

- MARKS, P.W.; MAXFIELD, F.R. - Transient increases in cytosolic free calcium appear to be required for the migration of adherent human neutrophils. **J Cell Biol.**, **110**: 43-52, 1990.
- McCULLOUGH, J.; CLAY, M.E.; PRIEST, J.R. - **Transfusion.**, **21**: 483, 1981.
- MELLO, S.B.V.; FARSKY, H.P.; SANNOMIYA, P. & GARCIA-LEME, J. - Inhibition of neutrophil chemotaxis and chemokinesis associated with a plasma protein in aging rats: selective depression of cell responses mediated by complement-derived chemoattractants. - **J Leukoc Biol.**, **51**: 46-52, 1992.
- METZMANN, E. - Protein Quantitation on both Branches of the Heidelberger Curve by Monitoring the Kinetic of Immunoprecipitation. **Behring Inst. Mitt.**, **78**: 167-175, 1985.
- MICHELSON, D.; GOLD, P.W.; STERNBERG, E.M. - The Stress Response in Critical Illness. **New Horizons.**, **2**: 426-431, 1994.
- MONJAN, A.A. & COLLECTOR, M.I. - Stress-Induced modulation of the Immune Response. **Science.**, **196**: 307-308, 1977.
- MORRISON, D.C.; KLINE, L.F. - Activation of the classical and properdin pathways of Complement by bacterial Lipopolysaccharides(LPS). **J Immunol** **118**: 362-368, 1977.

- NORMAN, K.E.; MOORE, K.L.; McEVER, R.P.; KLAUS, L. - Leukocyte rolling *in vivo* is mediated by P-selectin glycoprotein Ligand-1. **Blood**, **85**: 4417-4421, 1995.
- OPDAHL, H. - Direct and indirect effects of E. coli lipopolysaccharide on isolated human polymorphonuclear granulocytes and mixed leukocytes. **Inflammation**, **17**: 57-73, 1993.
- PARRILLO, J.E. & FAUCI, A.S. - Mechanisms of glucocorticoid action on immune processes. **Ann Ver Pharmacol Toxicol.**, **19**: 179-201, 1979.
- PHILLIPS, M.L.; NUDELMAN, E.; GAETA, F.C.H. - ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, Sialyl-Le^x. **Science.**, **250**: 1130, 1990.
- POLLACK, M.M.; YEH, T.S.; RUTTIMANN, U.E. - Evaluation of pediatric intensive care. **Crit Care Med.**, **12**: 376-383, 1984.
- POLLACK, M.M.; RUTTIMANN, U.E.; GETSON, P.R.- The Pediatric Risk of Mortality (Prism Score). **Crit Care Med.**, **16**: 1110-1116, 1988.
- RAETZ, C.R.H. - Biochemistry of endotoxins. **Annu. Rev. Biochem.**, **59**: 129-170, 1990.
- RAETZ, C.R.H.; ULEVITCH, R.J.; WRIGHT, S.D.; SIBLEY, C.H.; DING, A.; NATHAN, F.A. - Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. **FASEB J.**, **5**: 2652-2660, 1991.

RAMPART, M. -Neutrophil-endothelial Cell Interactions, Chapter 5.

Immunopharmacology of the Microcirculation. Academic Press Limited, San Diego, 1994, 77-97.

RICHARDS, L.K. & McCULLOUGH, J. - A modified microchamber method for chemotaxis and chemokinesis. **Immunological Communications.**, **13(1)**: 49-62, 1984.

ROCCO, J.R. & DAVID, C.M. - Prognóstico do Choque Séptico: 1-Análise de 505 pacientes internados no CTI-HUCF/UFRJ, no período de 1981 a 1988. **Rev Bras Terap Intens.**, **5(4)**:49-57, 1993.

ROITT, I.M. In: **Immunology.** 2nd ed. Chapter 1, p:1.1-1.9, Gower Medical Publishing, 1989.

ROLLERI, E.; ZANNINO, M.; ORLANDINI, S.; MALVANO, R.- **Clin Chim Acta** **66**: 319, 1976.

SANNOMIYA, P.; PEREIRA, M.A.; GARCIA-LEME, J. - Inibition of leukocyte chemotaxis by serum factor in diabetes mellitus: Selective depression of cell responses mediated by complement-derived chemoattractants. **Agents and Actions**, **30**: 369-376, 1990.

SANNOMIYA, P. - **Estudos sobre a inibição da quimiotaxia por fatores plasmáticos.** São Paulo, 1992. [Tese - Livre docência - Universidade de São Paulo].

- SCHMALTSTIEG, F.C.; RUDLOFF, H.E.; HILLMAN, G.R. & ANDERSON, D.C. - Two-dimensional and three-dimensional movement of human polymorphonuclear leukocytes: Two fundamentally different mechanisms of location. **J. Leukocyte Biol.**, **40**: 677-691, 1986.
- SHIN, H.S.; SNYDERMAN, R; FRIEDMAN, E.; MELLORS, A. & MAYER, M.M. - A chemotactic and anaphylatoxic fragment cleaved from guinea pigs C'5 by EAC' 1^a,4,2^a,3. **Science.**, **162**: 361-363, 1968.
- SKALAK, R.; CHIEN, S.; SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W. - Viscoelastic deformation of white cells: theory and analysis. In: **White Cell Mechanics: Basic Science and Clinical Aspects**. Eds. H. J. Meiselman; Lichtman & P. L. LaCelle. New York, Alan R. Liss, 1984. p: 3-18.
- SOUZA, G.E.P.; CUNHA, F.Q.; MELLO, R; FERREIRA, S.H. - Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents and Actions.**, **24**: 377-380, 1988.
- STERNBERG, E.M.; CHROUSOS, G.P.; WILDER, R.L. & GOLD, P.W. - The Stress response and the regulation of inflammatory disease. **Ann Intern Med.**, **117**: 854-856, 1992.
- THELEN, M.; UGUCCIONI, M. & BÖSIGER, J. - PI 3-Kinase-dependent and independent chemotaxis of human neutrophil leukocytes. **Biochem Biophys Res Commun.**, **217**: 1255-1262, 1995.

TODD, R.F. & FREYER, D.R. - The CD11/CD18 leukocyte glycoprotein deficiency. **Hematol Oncol Clin North Am.**, **2**: 13, 1988.

VENAILLE, J.T.; MISSO, N.L.A.; PHILLIPS, J.M.; ROBINSON, B.W.S. & THOMPSON, P.J. - Effects of different density gradient separation techniques on neutrophil function. **Scand J Clin Lab Invest.**, **54**: 385-391, 1994.

WARDEN, D.W.; MASON, A. D. JR & PRUITT, B.A. JR - Evaluation of leukocyte chemotaxis *in vitro* in thermally injured patients. **J Clin Invest.**, **54**: 1001-1004, 1974.

WARDEN, G.G.; MASON, A.D. Jr.; PRUITT, B.A. JR. - Suppression of leukocyte chemotaxis *in vitro* by chemotherapeutic agents used in the management of thermal injuries. **Ann Surg.**, **181**: 363-369, 1975.

WEISS, S.J. - Tissue destruction by neutrophils. **N Eng J Med.**, **320**: 365, 1989.

WILLIAMS, J.W.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A.J.; LICHTMAN, M.A. - Neutrophilia related to drugs. **Hematology**. 4th. ed. 1990. p.817-820.

WILKINSON, P.C. - Micropore filter methods for leukocyte chemotaxis. **Methods in enzymology.**, **162**: 38-45, 1988.

WILKINSON, P.C.; HASTON, W.S. - Chemotaxis: An overview. **Methods in enzymology**, **162**: 3-17, 1988.

WRIGHT, S.D. & JONG, M.T.C. - Adhesion-promoting receptors on human macrophages recognize *Escherichia coli* by binding to lipopolysaccharide. **J Exp Med.**, **164**: 1876-1888, 1986.

WRIGHT, S.D. & DETMERS, P.A.; - Adhesion-promoting receptors on phagocytes. **J Cell Sci.**, **9 (Suppl.)**: 99-120, 1988.

WRIGHT, S.D.; TOBIAS, P.S.; ULEVITCH, R.J.; RAMOS, R.A. - Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. **J Exp Med.**, **170**: 1231-1241, 1989.

YAMADA, H.; NAGAOKA, I.; TAKAMORI, K. & OGAWA, H. - Double filtration plasmapheresis enhances neutrophil chemotactic responses in hyperimmunoglobulin E Syndrome. **Artif Organs.**, **19**: 98-102, 1995.

ZIGMOND, S.H.; HIRSCH, J.G. - Leukocyte locomotion and chemotaxis. New *in vitro* methods for evaluation and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. **J Exp Med.**, **137**: 387-410, 1973.

X. ANEXOS

**ANEXO 1. FICHA DE CADASTRAMENTO REFERENTE A
PACIENTES DO PROTOCOLO "A"**

DADOS PESSOAIS

Nome: _____ Idade: _____

DN: ____/____/____

Endereço: _____

Controle () nº Registro: HC- _____

Nome: _____ Idade: _____

Paciente () nº Registro: HC- _____ Data de Internação: ____/____/____

Data do experimento: ____/____/____

PROCEDIMENTOS:

	Controles	Pacientes
Contagem de células (câmara de Neubauer)		
Leitura após fixação (duplicatas- 5 campos)	células/campo	células/campo
M. ESPONTÂNEA (ME)		
SORO ATIVADO CONT.		
SORO ATIVADO PAC.		

EXAMES COMPLEMENTARES:

	Controle	Paciente
Hb./Htc.		
leucócitos		
bast.		
seg.		
linf.		
mon.		
eos.		
bas.		
trans. plasma <24h.		

OBSERVAÇÕES: _____

**ANEXO 2. FICHA DE CADASTRAMENTO DE PACIENTES INCUBADOS
EM SOROS NÃO ATIVADOS COM LPS 10% (PROTOCOLO
“PILOTO”)**

DADOS PESSOAIS

Nome: _____ Idade: _____

DN: ____/____/____

Endereço: _____

Controle () nº Registro: HC- _____

Nome: _____ Idade: _____

Paciente () nº Registro: HC- _____ Data de Internação: ____/____/____

Data do experimento: ____/____/____

PROCEDIMENTOS:

	Controles	Pacientes
Contagem de células (câmara de Neubauer)		
Leitura após fixação (duplicatas- 5 campos)	células/campo	células/campo
ME		
S. PURO DO CONTROLE		
S. PURO DO PACIENTE		
CORTISOL (µg/dL)		
C3c (mg/dL)		
C4 (mg/dL)		

EXAMES COMPLEMENTARES:

	Controle	Paciente
Hb./Htc.		
leucócitos		
bast.		
seg.		
linf.		
mon.		
eos.		
bas.		
trans. plasma <24h.		

OBSERVAÇÕES: _____

ANEXO 3. FICHA DE CADASTRAMENTO REFERENTE A PACIENTES DO PROTOCOLO “B”

DADOS PESSOAIS

Nome: _____ Idade: _____

DN: ____/____/____

Endereço: _____

Controle () nº Registro: HC- _____ Nome: _____

Paciente () nº Registro: HC- _____ Data de Internação: ____/____/____

Data do experimento: ____/____/____

PROCEDIMENTOS:

	Controles
Contagem de células (câmara de Neubauer)	
Leitura após fixação (duplicatas- 5 campos)	(μm)
MNEM	
LPS 1%	
LPS 3%	
LPS 10%	
CORTISOL($\mu\text{g/dL}$)	
C3c (mg/dL)	
C4 (mg/dL)	

ANEXO 4. NÍVEIS SÉRICOS DE CORTISOL DE CONTROLES E PACIENTES

Nº	Controles		Pacientes		nmol/L
	Protocolo	µg/dL	Protocolo	µg/dL	
1	A	11,4	314,52	P	29,8
2	A	10,7	295,21	A	33,31
3	A	7,8	215,21	A	16,4
4	A	9,2	253,82	A	21,62
5	A	19,3	532,48	A	33,3
6	A	11,8	325,56	A	9,2
7	A	10,5	289,69	A	29,5
8	A	15,8	435,92	A	12
9	A	5,7	896,39	A	3,9
10	A	12,2	336,59	A	13,5
11	B	16,5	455,23	A	9,5
12	B	14,8	408,33	A	27,5
13	B	33,3	918,74	A	16,8
14	B	8,5	242,01	A	26,5
15	B	9,6	918,74	A	17,8
16	B	13,7	377,98	A	33,3
17				A	1,22
18				A	13,22
19				A	25,2
20				A	24,4
21				B	20,6
22				B	33,31
23				B	24,2
24				B	15,2
25				B	20
26				B	13,7
27				P	24,8

níveis de cortisol (1µg/dL= 27,59 nmol/L)
 controles(n=16), pacientes(n=27)

**ANEXO 5. NÍVEIS SÉRICOS DAS FRAÇÕES C3_c E C4 DO COMPLEMENTO
EM 14 CONTROLES E 31 PACIENTES**

Nº	CONTROLES		PACIENTES	
	C3c(mg/dL)	C4(mg/dL)	C3c(mg/dL)	C4(mg/dL)
1	74,2	28,4	62,3	32,9
2	112	48,4	42,2	26
3	55,1	19,1	62,6	20,6
4	107	36,5	79,8	26
5	55,3	11,9	68,5	22,6
6	75	25,8	81,6	19,6
7	84	28,3	109	34,4
8	83	44	115	53
9	111	62,8	100	28,8
10	64,3	21,4	83,4	24
11	81	41,4	48,9	16,7
12	105	31,4	52,5	13,3
13	101	32,5	64,9	13,2
14	83,9	20,9	113	28,8
15			112	19,4
16			102	35,6
17			29,9	11
18			54,5	12,5
19			112	23,7
20			37,7	10,1
21			72,5	16,5
22			67	15,9
23			52,9	17,4
24			106	45,7
25			35,9	7,91
26			45,4	19,6
27			56,8	13,7
28			52,2	20
29			79,7	30,8
30			101	39,7
31			91,3	25,3

**ANEXO 6. ÍNDICE DE QUIMIOTAXIA DE 10 CONTROLES
E 18 PACIENTES - PROTOCOLO "A"**

ÍNDICE DE QUIMIOTAXIA			
Nº	IQc	IQp	
1	256,2	407,6	
2	323,3	140	
3	99,96	407,4	
4	106,8	169,1	
5	1127,5	177,7	
6	311,5	195,5	
7	260	103,5	
8	206,4	594,4	
9	203	720	
10	216,5	312,7	
11		287,5	
12		346,1	
13		77,2	
14		125,7	
15		140,4	
16		311,4	
17		197,6	
18		180,3	
IQc= Índice de quimiotaxia de controles			
IQp= Índice de quimiotaxia de pacientes			

ANEXO 7a. QUIMIOTAXIA DE POLIMORFONUCLEARES DE CONTROLES E PACIENTES INCUBADOS EM MEIO DE CULTURA (ME) E EM SEUS RESPECTIVOS SOROS INCUBADOS COM LPS 10%

PACIENTES	INCUBAÇÃO EM MEIO			INCUBAÇÃO EM LPS 10%		
	PMNs Controle	PMNs Pacientes		PMNs Controle	PMNs Pacientes	
Nº	n=10	n=18		n=10	n=18	
	6,4	1,3		16,4	5,3	
	3,75	10		12,15	14	
	14,1	5,4		14,1	22	
	7,45	13,3		8	22,5	
	0,95	15,3		10,7	27,2	
	4,1	15,6		12,15	30,5	
	5,5	25,1		14,3	26	
	3,25	1,8		6,85	10,7	
	4,4	1,5		9,05	10,8	
	4,1	5,5		8,4	17,2	
		1,6			4,6	
		1,3			4,5	
		2,2			1,7	
		3,5			4,4	
		8,4			11,8	
		7			21,8	
		4,3			8,5	
		5,1			9,2	

**ANEXO 7b. INCUBAÇÃO DE POLIMORFONUCLEARES DE CONTROLES
E PACIENTES, EM SORO CONTROLE ATIVADO COM LPS 10%.**

INCUBAÇÃO EM SORO DO CONTROLE ATIVADO COM LPS 10%		
Nº	PMNs de Controle	PMNs de Pacientes
1	16,4	9,1
2	12,15	12
3	14,1	17
4	8	18,5
5	10,7	19,1
6	12,15	21
7	14,3	17,1
8	6,85	10,1
9	9,05	9,4
10	8,4	6,8
11		12,1
12		4,4
13		2,5
14		6,1
15		12,5
16		16
17		7
18		10,8

ANEXO 7c. INCUBAÇÃO DE POLIMORFONUCLEARES DE CONTROLES E PACIENTES, EM SORO DO PACIENTE ATIVADO COM LPS 10%

INCUBAÇÃO EM SORO DO PACIENTE ATIVADO COM LPS 10%		
Nº	PMNs de Controle	PMNs de Pacientes
1	16	5,3
2	11	14
3	9,6	22
4	15,4	22,5
5	19,1	27,2
6	8,6	30,5
7	4,7	26
8	10,1	10,7
9	9,4	10,8
10	12,1	17,2
11	5,3	4,6
12	15,5	4,5
13	7,6	1,7
14	6,4	4,4
15	5,1	11,8
16	8,4	21,8
17	9,2	8,5
18	7,1	9,2

**ANEXO 8. QUIMIOTAXIA DE POLIMORFONUCLEARES DE 18
PACIENTES DO PROTOCOLO “A”, CLASSIFICADOS
POR TIPO DE PATOLOGIAS AO SEREM ADMITIDOS
NA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA PEDIÁTRICA**

		PATOLOGIAS	
PACIENTES	INFECCIOSAS	NÃO INFECCIOSAS	
Nº	C/C	C/C	
1	5,3	14	
2	22	27,2	
3	22,5	26	
4	30,5	10,8	
5	10,7	17,2	
6	4,6	1,7	
7	4,5	11,8	
8	4,4		
9	21,8		
10	9,5		
11	9,2		
C/C= Células por campo(unidade de quimiotaxia)			

**ANEXO 9. QUIMIOTAXIA DE POLIMORFONUCLEARES DE 18
PACIENTES DO PROTOCOLO “A”, CLASSIFICADOS
POR FAIXAS ETÁRIAS.**

	FAIXAS ETÁRIAS		
Pacientes	1-5a	5-9a	9-14a
	C/C	C/C	C/C
1	5,3	26	27,2
2	14	22	10,8
3	30,5	22,5	4,4
4	10,7	4,5	11,8
5	17,2	9,2	21,8
6	4,6		8,5
7	1,7		
C/C= Células por campo(unidade de quimiotaxia)			

ANEXO 10. INCUBAÇÃO DE PMNs DE INDIVÍDUOS SADIOS EM SORO DE CONTROLES. O AGENTE INDUTOR DE QUIMIOTAXIA FOI O LIPOPOLISSACÁRIDE DE E. COLI A 1, 3 E 10%

SORO DE CONTROLES				
Nº	ME	LPS 1%	LPS 3%	LPS 10%
	µm	µm	µm	µm
1	74	86	99	106
2	67	67	70	84,2
3	42	60	47	41
4	86	102	96	76
5	66	76	75	72
6	57	68	91	70
7	42	83	81	60
8	41	61	60	50
9	14	21	27	28
10	57	72	60	18
11	21	39	36	21
ME= Migração espontânea				
LPS= Concentrações de lipopolissacáride (E.coli)				

ANEXO 11. INCUBAÇÃO DE PMNs DE INDIVÍDUOS SADIOS EM SORO DE PACIENTES. O AGENTE INDUTOR DE QUIMIOTAXIA FOI O LIPOPOLISSACÁRIDE DE E. COLI A 1, 3, E 10%

SORO DE PACIENTES				
Nº	ME	LPS 1%	LPS 3%	LPS 10%
	µm	µm	µm	µm
1	60	53	55,4	56,4
2	26	32	46	51
3	40	44	60	21
4	58	80	91	46
5	53	67	67	55
6	27	27	39	45
7	30	63	72	36
8	38	48	58	22
9	9	10	19	13
10	33	51	63	36
11	0	15	11	11
ME= Migração espontânea				
LPS= Concentrações de lipopolissacáride (E.coli)				

ANEXO 12. NÍVEIS DE CORTISOL SÉRICOS EM 16 CONTROLES E 27 PACIENTES. AS DOSAGENS INCLUEM INDIVÍDUOS QUE PARTICIPARAM DOS TRÊS PROTOCOLOS CLÍNICOS

Nº	Controles			Pacientes		
	Protocolo	µg/dL	nmol/L	Protocolo	µg/dL	nmol/L
1	A	11,4	314,52	P	29,8	822,18
2	A	10,7	295,21	A	33,31	918,79
3	A	7,8	215,21	A	16,4	452,47
4	A	9,2	253,82	A	21,62	595,94
5	A	19,3	532,48	A	33,3	910,47
6	A	11,8	325,56	A	9,2	253,82
7	A	10,5	289,69	A	29,5	813,91
8	A	15,8	435,92	A	12	331,08
9	A	5,7	896,39	A	3,9	107,62
10	A	12,2	336,59	A	13,5	372,46
11	B	16,5	455,23	A	9,5	262,12
12	B	14,8	408,33	A	27,5	758,72
13	B	33,3	918,74	A	16,8	463,51
14	B	8,5	242,01	A	26,5	731,13
15	B	9,6	918,74	A	17,8	491,11
16	B	13,7	377,98	A	33,3	918,78
17				A	1,22	33,11
18				A	13,22	364,18
19				A	25,2	698,26
20				A	24,4	645,61
21				B	20,6	568,35
22				B	33,31	910,47
23				B	24,2	667,67
24				B	15,2	419,36
25				B	20	551,81
26				B	13,7	376,75
27				P	24,8	684,23

níveis de cortisol (1µg/dL= 27,59 nmol/L)
controles(n=16), pacientes(n=27)