

FACULDADE PERNAMBUCANA DE SAÚDE - FPS
INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA- IMIP



**“EXRESSÃO DE NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS EM CRIANÇAS
COM INFECCÇÕES BACTERIANAS INVASIVAS.”**

Trabalho de pesquisa do Programa de Iniciação Científica do PIBIC/CNPq IMIP com vigência 2013-2014.

Bolsista: Luana Nobre de Abreu Carvalho

Orientadora: M^a do Carmo M. B. Duarte

Co-orientadoras: Leuridan Cavalcante Torres e Nara Vasconcelos Cavalcanti

Colaboradores: Jailson de Barros Correia e Marina Cadena da Matta

Recife, junho de 2014.

“EXRESSÃO DE NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS EM CRIANÇAS COM INFECÇÕES BACTERIANAS INVASIVAS.”

Luana Nobre de Abreu Carvalho¹; Leuridan Cavalcante Torres²; Nara Vasconcelos Cavalcanti³; Isabelle Hsu Lee⁴; Jailson de Barros Correia⁵; Marina Cadena da Matta⁶; Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte⁷.

¹ Aluna do curso de graduação de Medicina da Faculdade Pernambucana de Saúde e bolsista do Programa de Iniciação Científica PIBIC/CNPq.

² Coordenadora do Laboratório de Pesquisa Translacional Prof. C. A. Hart; Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional - CNPq/ FACEPE; Tutora da Pós-graduação stricto sensu em Saúde Materno Infantil do IMIP.

³ Médica Pediatra do IMIP e do Hospital Universitário Oswaldo Cruz.

⁴ Aluna do curso de graduação de Medicina da Faculdade Pernambucana de Saúde e bolsista do Programa de Iniciação Científica PIBIC/CNPq.

⁵ Docente da Pós-graduação stricto sensu do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP.

⁶ Mestranda da Pós-graduação em Saúde Materno Infantil

⁷ Docente da Pós-graduação stricto sensu do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira - IMIP; coordenadora da UTI Pediátrica do Hospital Esperança.

⁷ Autor correspondente: mcduarte2010@gmail.com

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Financiamento: FACEPE (Processo No. 1279-4.01/10).

RESUMO

Objetivo: avaliar as concentrações séricas de citocinas em crianças e adolescentes internados no Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) com diagnóstico de sepse e pneumonia comunitárias. **Método:** estudo prospectivo, tipo corte transversal. A coleta de dados foi realizada no período de agosto de 2012 a setembro de 2013. Foram incluídos no estudo crianças com idade maior de 29 dias a 14 anos com diagnóstico clínico de pneumonia e/ou sepse comunitárias, dentro das primeiras 48 horas de internamento no IMIP. Foram excluídos as portadoras de imunodeficiência primária ou secundária, de cardiopatias congênitas complexas, anemia falciforme, com má-formações intra e extratorácicas, de síndrome nefrótica, as que foram internadas previamente nos últimos 30 dias. O critério de sepse seguiu as recomendações do Consenso Internacional de Sepse Pediátrica e pneumonia foi definida por critério clínico baseado na presença de febre, tosse e/ou dificuldade respiratória e taquipneia. A mensuração das concentrações sanguíneas de citocinas foi realizada pelo BDTM CBA – kit inflamatório humano IL-10 e IL-17 subunidades A e F através da citometria de fluxo. Foi realizada análise descritiva (distribuição de frequência, mediana e intervalo interquartil - IIQ₂₅₋₇₅) e análise estatística dos dados, utilizando-se testes não paramétricos (Mann Whitney U test) para comparação dos dois grupos (pneumonia e sepse). **Resultados:** 58 crianças foram avaliadas, sendo 17 pneumonias e 41 sepse. Em relação a IL-17, as concentrações da subunidade IL-17F foram mais elevadas, quando comparadas as da subunidade de IL-17A, tanto nas crianças com pneumonia quanto nas com sepse ($p=0.0001$). Não se verificou diferença nas concentrações de IL-10 e IL-17 nos grupos de crianças com pneumonia e sepse. **Conclusão:** o estudo demonstrou que em crianças com pneumonia ou sepse a mediana da concentração da subunidade IL-17F foi mais elevada, quando comparada a da subunidade de IL-17A.

Palavras-chave: citocinas; IL-17; imunidade, infecções bacterianas; pneumonia; sepse.

ABSTRACT

Objective: To evaluate blood levels of cytokines in children and adolescents admitted to Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) diagnosed with sepsis and/or community acquired pneumonia. **Methods:** a prospective cross-sectional study was performed between August 2012 and September 2013. Children were enrolled if older than 28 days and younger than 14 years with a clinical diagnosis of pneumonia and/or sepsis within 48 hours of hospital admission. Exclusion criteria were a previous diagnosis of primary or secondary immunodeficiency, congenital heart disease hemodynamically significant, sickle cell disease and chronic encephalopathy, nephrotic syndrome, those who were previously hospitalized in the last 30 days. Sepsis diagnosis followed recommendations of the International Pediatric Sepsis Consensus and pneumonia was defined by clinical criteria based on the occurrence of fever, cough and/or respiratory distress and tachypnea. Blood levels of cytokines were measured by flow cytometry using BD™ CBA – human inflammatory kit IL-10 e IL-17 (subunits A e F). Descriptive analysis was performed (frequency distribution, median and interquartile range). Additionally, statistical analysis was undertaken using non-parametric tests (Mann Whitney test), in order to compare cytokines levels between the two groups (pneumonia and sepsis). **Results:** 58 children were evaluated, 17 had pneumonia and 41 sepsis. Considering IL-17, blood levels of subunit IL-17F were higher, when compared to subunit IL-17A, in both groups of children with pneumonia and sepsis ($p=0.0001$). There was no difference on blood levels of cyotkines in children with pneumonia and sepsis. **Conclusion:** in children with pneumonia or sepsis, blood levels of subunit IL-17F were higher, when compared to subunit IL-17A.

Key words: citokynes; IL-17; immunity, bacterial infections; pneumonia; sepsis.

INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas invasivas na criança representam um problema de saúde pública mundial. Estima-se que as infecções respiratórias agudas causam mais de 4 milhões de mortes em crianças menores de 5 anos, anualmente, em todo o mundo, sendo mais de 2 milhões decorrentes de pneumonias^{1,2,3}. A sepse é a maior causa de morbimortalidade em crianças, sendo a sepse grave responsável por mais de 4.300 mortes anualmente nos Estados Unidos, representando cerca de 7% de mortes infantis⁴.

As infecções bacterianas invasivas desencadeiam uma resposta inflamatória a qual varia de intensidade dependendo de interações microbiológicas, fatores genéticos do hospedeiro e/ou ambientais⁵. A desregulação da resposta imune do hospedeiro pode propiciar uma resposta inflamatória exacerbada^{6,7,8}.

Estudos em adultos com infecção pulmonar demonstraram aumento do nível sérico de alguns mediadores inflamatórios como proteína C reativa (PCR), fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina (IL) 6, IL-10 e antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra)^{3,5,9}. Rivers *et al.*, 2013, em estudo de revisão em adultos demonstrou que há um pico inicial nos níveis de IL-1 β , IL-6 e IL-10 na pneumonia, sepse grave e choque séptico, tais níveis se mensurados precocemente poderiam antecipar a terapêutica mais adequada a gravidade e contribuir para a diminuição de índices de mortalidade nesta população¹⁰. O mesmo autor relata ainda que níveis de IL-10 elevados e sustentados possuem valor prognóstico quanto à mortalidade em casos de sepse^{5,10}. Tais achados são bem descritos para a população adulta, porém em crianças verifica-se uma escassez de dados sobre a expressão de citocinas na pneumonia e sepse.

Um dos poucos estudos que analisou exclusivamente a população pediátrica incluiu crianças com sepse que evoluíram com coagulação intravascular disseminada (CIVD) e verificou

na admissão níveis aumentados de IL-6, IL-8 e IL-10a, assim como, valores logarítmicos maiores de IL-6, IL-8 e IL-10 nos indivíduos que foram a óbito quando comparados aos sobreviventes¹¹. Outro estudo verificou níveis de IL-10 e TNF- α significativamente mais altos em pacientes pediátricos que foram a óbito quando comparados ao grupo controle¹².

Mais recentemente, a IL-17 tem sido investigada no contexto de doenças autoimunes e inflamatórias em crianças, mas a contribuição desta citocina na patogênese de doenças ainda permanece pouca esclarecida¹³. No entanto, há poucos estudos sobre o papel da IL-17 em infecções bacterianas do trato gastrointestinal e escassez em infecções bacterianas do trato respiratório¹⁴.

Estudos evidenciam que IL-17 promove a ativação e migração de neutrófilos para o sítio da infecção por induzir, fortemente, a expressão da quimiocina IL-8¹³. A subunidade IL-17A destaca-se nas funções de aumentar a produção de peptídeo antimicrobiano (β defensina-2), participar da formação de iBALT (**definicao**), aumentar a expressão do receptor de imunoglobina polimérica nas células epiteliais da mucosa de vias aéreas^{13,14,15}. Estudo experimental em ratos mostrou que a inibição da IL17 está associada com aumento da mortalidade na infecção pulmonar bacteriana¹⁶.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a expressão de citocinas IL-10 e IL-17 (subunidades A e F) em crianças internadas com infecção bacteriana invasiva.

MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) (No. 3817/13). Trata-se de um estudo prospectivo, exploratório translacional no qual foram incluídas crianças e

adolescentes com idade maior que 29 dias a 14 anos admitidos no IMIP com diagnóstico clínico de sepse de acordo com o Consenso Internacional de Sepse Pediátrica⁴ ou de pneumonia baseado na presença de febre, tosse e/ou dificuldade respiratória e taquipneia idade-específica em anos conforme recomendações da Organização Mundial de Saúde¹⁷. Foram excluídas as crianças com cardiopatia congênita hemodinamicamente significativa, deformidades e/ou malformações intratorácicas; comprometimento da função pulmonar, portadores de encefalopatias crônicas ou doenças neuromusculares; imunodeficiência primária ou secundária previamente diagnosticada; parada cardiorrespiratória submetida à manobra de ressuscitação cardiopulmonar; anemia falciforme; síndrome nefrótica; imunodepressão induzida por drogas.

A coleta de dados foi realizada no período de agosto de 2012 a setembro de 2013 nas crianças com até 48 horas de internamento no IMIP ou quando transferido de outro hospital. As variáveis avaliadas foram idade, sexo, síndrome clínica, concentração sérica de citocinas e leucograma dos pacientes. Inicialmente os responsáveis pelas crianças assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e então, responderam um questionário com as variáveis de interesse do estudo e, em seguida, foi coletada a amostra do sangue periférico, a qual foi processada para separação de plasma e posterior análise de citocinas.

Para determinação da concentração da citocina IL-10 foi utilizado BDTM CBA – *Human inflammatory kit* (IL-10) e BDTM CBA *TH1/TH2/TH17* (IL-10), conforme instrução do fabricante. A determinação da concentração foi realizada por citometria de fluxo (FACSVERSE®, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). A análise foi realizada no *FCAP Array software* (BD BIOSCIENCES, CA). A concentração sérica da citocina IL-17 F foi determinada nas amostras de soro dos pacientes por enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), utilizando o Human IL-17 DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). A leitura da absorbância foi

realizada com a leitora de placas HumaReader HS (Human, Wiesbaden, Germany) e a análise foi realizada com o software Graphpad Prism e as concentrações expressas em pg/mL.

As informações obtidas foram digitadas em um banco de dados criado no Excel de domínio público. Foi realizada análise descritiva (distribuição de frequência, mediana e intervalo interquartil - IIQ_{25-75}). A comparação das medianas das citocinas IL-10 e IL-17 entre os dois grupos (pneumonia e sepse) foi realizada pelo teste t não paramétrico de *Mann-Whitney* através do programa GraphPadPrism 5. Foi adotado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

No estudo, foram avaliadas 58 crianças, destas 17 compuseram o grupo de pneumonia representando 29,3%, enquanto que 41 crianças formaram o grupo de sepse, representando 70,7% das crianças. A idade das crianças variou entre um e 156 meses com mediana de 22 meses. Em relação ao gênero, o mais frequente foi o sexo masculino com 54,3% dos casos. Quanto à contagem de leucócitos totais, a mediana foi de 11.600 células variando de 4.300 a 36.200 células/mm³ (vide Tabela 1).

Em relação a IL-17, as concentrações da subunidade IL-17F foram mais elevadas, quando comparadas as da subunidade de IL-17A, tanto nas crianças com pneumonia, quanto nas com sepse ($p=0.0001$). Entretanto, não foi verificada diferença significativamente estatística em relação as IL-10 e IL-17, subunidades A e F, entre as duas síndromes clínicas (vide Tabela 2).

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a expressão sérica das citocinas IL-10 e IL-17 (subunidades A e F) em crianças e adolescentes com diagnóstico de sepse e pneumonia comunitária. Estudos

anteriores evidenciaram a importância de biomarcadores no diagnóstico e prognóstico dos pacientes com infecções bacterianas invasivas, destacando-se as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10^{4,18, 19}.

Interleucina 17 é uma citocina pró-inflamatória recentemente descrita (1995/6), que pode ter um papel importante na auto-imunidade e na infecção²⁰. Dado de interesse no presente estudo foi o aumento da mediana das concentrações da subunidade IL-17F, quando comparada à mediana da IL-17A, tanto nas crianças com pneumonia, quanto nas com sepse. Na literatura pesquisada não se encontrou outro estudo sobre esta questão. No entanto, sabe-se que a subunidade IL-17F apresenta 55% de sua molécula homóloga a subunidade IL-17A e possuindo funções semelhantes, porém em menores extensões, sendo favorecida por sinergismo com TNF- α , o que os tornam equivalentes a IL-17A¹³.

No presente estudo não se verificou diferença nas concentrações de citocinas IL-10 e IL-17 nos grupos de crianças com pneumonia e sepse comunitária. Em relação a IL-10, estudo de revisão que avaliou citocinas nas zero, três, seis, 12, 24, 48, 60 e 72 horas mostrou níveis mais elevados de IL-6, IL-10 e IL-1 β na apresentação inicial (zero hora)¹⁰. Além disso, verificou que níveis elevados e mantidos de IL-10 foram preditores de gravidade e mortalidade na sepse^{10,21}. Os achados do presente estudo podem ser justificados pela realização de apenas uma coleta de sangue, sendo esta, nas primeiras 48 horas de internamento e por poucas crianças terem sido classificadas como sepse grave/choque séptico.

Apesar da importância do presente estudo, faz-se necessário destacar algumas limitações: primeiro, o tamanho amostral pequeno. Segundo, a maioria das crianças avaliadas com sepse foi de foco pulmonar e devido à baixa especificidade dos critérios diagnósticos adotados pelo consenso internacional de sepse pediátrica não foi possível demonstrar diferença entre os grupos.

Terceiro, a dificuldade de se incluir crianças muito graves, uma vez que os casos de choque séptico não puderam ser arrolados. Apesar de o IMIP ser considerado hospital terciário de referência ele recebe pacientes graves transferidos de outros serviços, com mais de 48 horas de internamento, portanto inelegíveis a participar do estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bradley JS, Byington CL, Shah SS, Alverson B, Carter ER, Swanson JT *et al.* The Management of Community-Acquired Pneumonia in Infants and Children Older than 3 Months of Age: Clinical Practice Guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Pediatric Community Pneumonia Guidelines*. CID 2011. (53): e25-e76.
2. Paiva MAS, Reis FJC, Fisher GB, Rozov T. I Consenso Brasileiro sobre Pneumonias. *Pneumonias na criança*. *Jornal da Pneumologia* 1998. 24(2): 101-8.
3. Chetty K, Thomson AH. Management of Community-Acquired Pneumonia in Children. *Pediatr Drugs*. 2007; 9 (6): 401-11.
4. Goldstein B, Giroir B, Randolph A, Members of International Consensus Conference Pediatric Sepsis. International Pediatric Sepsis Consensus Conference: Definitions for Sepsis and Organ Dysfunctions Pediatrics. *Pediatric Critical Care Medicine*. 2005. (6):2-8.
5. Michelow IC, Katz K, McCracken GH, Hardy RD. Systemic Cytokine Profile in Children With Community-Acquired Pneumonia. *Pediatric Pulmonology*. 2007 (42):640–645.
6. Ward, P. A. (2012), New approaches to the study of sepsis. *EMBO Mol Med*, 4: 1234–1243
7. DeLeo FR, Diep BA, Otto M. Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. *Infectious disease clinics of North America*. 2009;23(1):17–34.
8. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. *The Biochemical Journal*. 2009;420(1):1–16.
9. Tejera A, Santolaria F, Diez ML, Alemán-Valls MR, González-Reimers E, Milena-Abril *et al.* Prognosis of community acquired pneumonia (CAP): Value of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) and other mediators of the inflammatory response. *Cytokine*. 2007 (38):117–123.
10. Rivers EP, Jaehne AK, Nguyen HB, Papamtheakis DG, Singer D, Klausner H *et al.* Early Biomarker Activity in Severe Shock and Contemporary review of Immunotherapy trials: not a time to give up, but give it earlier. *SHOCK*. 2013 (39):127Y137.
11. Dalton HJ, Carcillo JA, Woodward DB, Short MA, Williams MD. Biomarker response to drotrecogin alfa (activated) in children with severe sepsis: Results from the RESOLVE clinical trial. *Pediatric Critical Care Medicine*. 2012(13):639-45.
12. Hatherill M, Tibby SM, Turner C, Ratnavel N, Murdoch IA. Procalcitonin and cytokine levels: relationship to organ failure and mortality in pediatric septic shock. *Critical care medicine*. 2000;28(7):2591–4.

13. Miossec, P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. Institute Pasteur. *Microbes and Infection* 11 (2009) 625-630.
14. Rubino SJ, Geddes K, Girardin SE. Innate IL-17 and IL-22 responses to enteric bacterial pathogens. *Trends in Immunology*. 2012, vol 33, n3 (112-118).
15. Wright AK, Banget M, Gritzfeld JF, Ferreira DM, Jambo KC, Gordon SB, *et al.* Experimental Human Pneumococcal Carriage Augments IL-17A- dependent T-cell Defence of the Lung. *PLOS pathogens*. 2013 volume 9, issue 3, e1003274.
16. Dubin PJ, Kolls JK, IL-23 mediates inflammatory responses to mucoid *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Am J Physiology Lung Cell Mol Physiol* (2006).
17. Clinical Management of Acute Respiratory infections in children: A WHO memorandum. *Bulletin of the World Health Organization*. 1981;59(5):707–16.
18. Christ-Crain M, Schuetz P, Müller B. Biomarkers in the management of pneumonia. *Expert Rev Respir Med*.2008;2(5):565-72.
19. Mera S, Oltean M, Tatulescu D, Cismaru C, Bondor C, Slavcocici, *et al.* Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. 2010 *APMIS* 119: 155-163.
20. Alyasin S, Karimi MH, Amin R, Babaei M, Darougar S. Interleukin-17 gene expression and serum levels in children with severe asthma. *Iran J Immunol*. 2013 Sep;10(3):177-85.
21. Martinez R, Torres A, Menendez R, Reyes S, Polverino E, Cilloniz C, *et al.* Factors associated with inflammatory cytokine patterns in community-acquired pneumonia. *European Respiratory Journal*. 2011; 37 393-399.

TABELAS

Tabela 1. Características de 58 crianças com pneumonia e sepse comunitária internadas no Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), 2012 a 2013.

Variáveis		
Idade (Mediana e amplitude)	22 meses	1 a 156 meses
Sexo		
Feminino (N, %),	45,7%	
Masculino (N, %)	54,3%	
Síndrome clínica (N, %)		
Pneumonia	17	29,3%
Sepse	41	70,7%
Leucócito total (Mediana e amplitude)	11.600	4.300 a 36.200

Fonte: IMIP.

Tabela 2. Concentrações de citocinas em 58 crianças com pneumonia e sepse comunitária internadas no Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), 2012 a 2013.

	Pneumonia (n=17)		Sepse (n=41)		P***
	N (%)*	Citocina pg/ml (Med; IIQ)**	N (%)	Citocina pg/ml (Med; IIQ)	
Citocinas TH2					
IL-10	17	2,8 (1,2-4,4)	41	1,8 (0,5-3,5)	> 0,05
Citocinas Th-17					
IL-17A	17	23,9 (15,3-28,3)	41	15,2 (0-27,8)	> 0,05
IL17F	5	5112 (3074-9984)	16	3043 (1809-7310)	> 0,05

*n (%): frequência absoluta e relativa dos pacientes nos quais as citocinas foram detectadas. **Med; IIQ – mediana e intervalo interquartil. ***Mann-Whitney *U* test.