

ARTIGO DE REVISÃO / REVIEW ARTICLE

A importância do macrófago na patofisiologia e no tratamento da sepsis

The importance of macrophages in the pathophysiology and treatment of sepsis

/ F. Machado¹

¹Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
Serviço de Doenças Infecciosas, Hospital de São João, Porto.

Patrocínios:

O presente estudo não foi patrocinado por qualquer entidade

Correspondência:

Filipe José Silva Machado
Alameda Prof. Hernâni Monteiro,
4200-319 Porto, Portugal
telefone: +351 916075068
email: filipejsmachado@gmail.com

/ Resumo

A sepsis afeta 30 milhões de pessoas mundialmente e em Portugal é responsável por 22% dos internamentos em Unidades de Cuidados Intensivos. A imunidade inata, nomeadamente o seu principal efetor, o macrófago, desempenham um importante papel na patofisiologia desta síndrome pois, entre outras funções, regula uma complexa e heterogénea rede pró e anti-inflamatória com a libertação de uma “tempestade de citocinas” após o reconhecimento de padrões conservados de microrganismos (PAMPs) pelos seus recetores *toll-like receptors* (TLR) e *nod-like receptors* (NLR). Algumas das citocinas libertadas como o *tumor necrosis factor* (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), *macrophage migration inhibitory factor* (MIF), *high mobility group box 1* (HMGB 1), interferão (INF- α), interleucina 6 (IL-6), *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) e os recetores *programmed death 1* (PD-1) e *programmed death ligand 1* (PDL-1) podem ser potenciais alvos para terapêutica imunológica. Contudo, apesar das falhas de inúmeros ensaios anteriores com este tipo de fármacos e, após uma revisão das potenciais causas para tal, destaca-se a possibilidade de utilizar fiéis biomarcadores como o *human leukocyte antigen-DR* (HLA-DR), TNF- α :IL-10 e PD-1/PDL-1 para caracterizar o estado imunológico do doente e assim facilitar a aplicação desta terapêutica que é muito dirigida mas que atua num mecanismo heterogéneo.

Palavras-chave: sepsis; macrófago; terapêutica imunológica

/ Abstract

Sepsis affects 3 million people worldwide and is responsible for 22% of the hospital admissions in Intensive Care Units. Innate immunity, namely the macrophage, its main effector, has an important role in this syndrome's pathophysiology because, between other functions, it regulates a complex and heterogeneous pro and anti-

Artigo recebido em
23/02/2016

Artigo aceite para publicação em
07/04/2016

inflammatory network with the release of a “cytokine storm” after the recognition of microorganism conserved patterns (PAMPs) by the macrophage receptors` toll-like receptors (TLR) and nod-like receptors (NLR). Some of the cytokines released are tumor necrosis factor (TNF-), interleukin 1 (IL-1), macrophage migration inhibitory factor (MIF), high mobility group box 1 (HMGB 1), interferon (INF-), interleukin 6 (IL-6), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and programmed death 1 (PD-1) and programmed death ligand 1 (PDL-1) receptors that can all be potential targets to immunologic therapies. Nevertheless, besides the previous failures of innumerous trials with this kind of drugs and, after the review of potential causes to that, we emphasize the necessity to use faithful biomarkers such as human leukocyte antigen-DR (HLA-DR), TNF: IL-10 and PD1/PDL-1 to characterize the patient`s immunologic state and thus be able to apply this kind of therapy that is very specific but actuate in a so heterogeneous mechanism.

Key-words: sepsis; macrophage; immunologic therapies

/ Introdução

A sepsis é um problema de saúde mundial, estimando-se que cerca de 30 milhões de pessoas sejam afetadas anualmente em todo o mundo e que dessas, uma elevada parcela morra ou fique com sequelas permanentes.¹ Portugal enquadra-se neste panorama com uma estimativa de que 22% dos internamentos em Unidades de Cuidados Intensivos sejam devidos a sepsis e com uma mortalidade hospitalar que ronda os 40%.^{2,3} Associando-se a estes números os elevados custos hospitalares destes doentes, esta síndrome torna-se inegavelmente um urgente e preocupante problema de saúde.¹ Sabe-se que foram inúmeros os insucessos das terapêuticas imunomoduladoras nas últimas décadas fazendo com que as estatísticas da sepsis se mantivessem com valores demasiado elevados e preocupantes para o desejável na sociedade atual.^{4,5} Uma vez que a imunidade inata tem um papel de relevo na fisiopatologia desta doença, nomeadamente através das funções do macrófago que é a principal célula efetora deste tipo de imunidade, para a compreensão das questões relacionadas com as terapêuticas imunológicas, focamos nesta revisão os aspetos mais importantes da imunidade inata e do macrófago na fisiopatologia da sepsis e ponderam-se ainda possíveis causas para as sucessivas falhas deste tipo de terapêuticas.^{6,7} Destacamos ainda alguns dos meios que tentam possibilitar uma correta adequação do fármaco imunomodulador ao doente, de forma individualizada, e ainda salientamos alguns dos principais mediadores imunológicos que se considera poderem ser usados como alvos terapêuticos.

/ Métodos

O trabalho apresentado é uma revisão da literatura do tipo monografia. As referências desta revisão foram identificadas por pesquisa na MEDLINE, através da Pubmed, com os termos: “Sepsis and innate immunity”, “macrophage and sepsis”, “cytokines and sepsis”, “biomarkers and sepsis” and “immunotherapies and sepsis”. Foram selecionados artigos de acordo com o título e/ou resumo, publicados entre janeiro de 1992 e fevereiro de 2016 e foram apenas incluídos artigos em Inglês. Outros artigos e referências considerados relevantes foram também selecionados e citados. Foram ainda incluídos uma circular normativa da Direção-Geral de Saúde e os dados de um artigo publicado no website www.world-sepsis-day.org.

/ Sepsis: definição e avaliação

As definições de sepsis foram revistas num renovado consenso internacional (Sepsis-3) que caracterizou esta síndrome como uma disfunção orgânica grave e potencialmente fatal, causada por uma desregulação da resposta do hospedeiro a uma infeção. De facto, ao passo que anteriormente a sua caracterização era suportada nos critérios da Síndrome de resposta inflamatória sistémica (SRIS), a sua definição centra-se agora na questão da disfunção orgânica relacionada com a infeção. Apesar dos critérios de SRIS poderem ainda ser úteis no auxílio do diagnóstico, o índice SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) é o instrumento apontado

para a identificação de doentes com disfunção orgânica com infecção. Apesar de tudo, não existe ainda nenhum teste diagnóstico *gold standard* para a sepsis.

O índice SOFA avalia diversos parâmetros como a relação PaO₂/FiO₂, contagem plaquetária, quantificação das bilirrubinas, pressão arterial média, escala de coma de Glasgow e, por fim, doseamento da creatinina e débito urinário.

Deste modo, uma pontuação igual ou superior a 2 neste índice, na sequência de uma infecção, parece sugerir o diagnóstico de sepsis, acarretando um risco acrescido de mortalidade de 10% comparativamente a pontuações inferiores. Não obstante, em pacientes fora do hospital ou em sala de emergência com apenas suspeita de infecção, pode ser rapidamente aplicado o qSOFA (*quick Sequential Organ Failure Assessment*), uma versão simplificada deste índice, realizada à cabeceira do doente, que inclui alterações do estado mental, pressão arterial sistólica igual ou inferior a 110 mmHg ou frequência respiratória igual ou superior a 22 ciclos/min. Assim, uma pontuação igual ou superior a 2 neste índice deverá motivar a pesquisa de disfunção de órgão com recurso do índice completo SOFA uma vez que estes doentes apresentam maior probabilidade de ter resultados desfavoráveis típicos de sepsis.⁹

/ O macrófago: importância na fisiopatologia e possível alvo terapêutico

De acordo com o conhecimento atual sobre a fisiopatologia da sepsis sabe-se que a imunidade inata assume um papel central no mecanismo da doença tendo o macrófago, principal efetor deste tipo de imunidade, um papel de destaque pelas suas funções no combate a agentes patogénicos através da libertação de citocinas, peptídeos antimicrobianos, radicais livres e pelas suas capacidades de fagocitose, opsonização e atividade microbicida.^{6,7}

Os macrófagos dividem-se em dois subgrupos: o tipo M1, sob influência do interferão gama (INF- α) que, com a sua ação estimuladora, promove a produção e libertação de citocinas pró-inflamatórias pelo macrófago em resposta a estímulos como a exposição a endotoxinas, ou ainda, o tipo M2, sob influência da interleucina 4, 10 e 13 (IL-4, IL-10 e IL-13) que, pela sua função desativadora, inibem a produção das citocinas pró-inflamatórias e promovem libertação de citocinas anti-inflamatórias.⁷ Esta variabilidade de resposta dos macrófagos a diferentes estímulos inflamatórios e a diferente sensibilidade a esses estímulos é explicada pela diferente forma de regulação dos genes das citocinas.⁹

As citocinas libertadas pelo macrófago são moléculas efectoras essenciais no desempenhar das funções da imunidade inata pois permitem, em conjunto com outros mediadores, promover a defesa do hospedeiro eliminando os agentes patogénicos invasores.^{7,9} A resposta inflamatória é então importante na defesa do hospedeiro,

bem como a resposta anti-inflamatória é essencial na contenção do processo inflamatório, contudo, se não houver um equilíbrio adequado entre ambas, tornam-se deletérias.^{4,5,9,10} Assim, as infeções levam à libertação de uma "tempestade de citocinas", pró e anti-inflamatórias e é o seu equilíbrio que determina o balanço final desta complexa rede de mediadores inflamatórios.^{4,11-15}

O papel dos recetores de superfície do macrófago

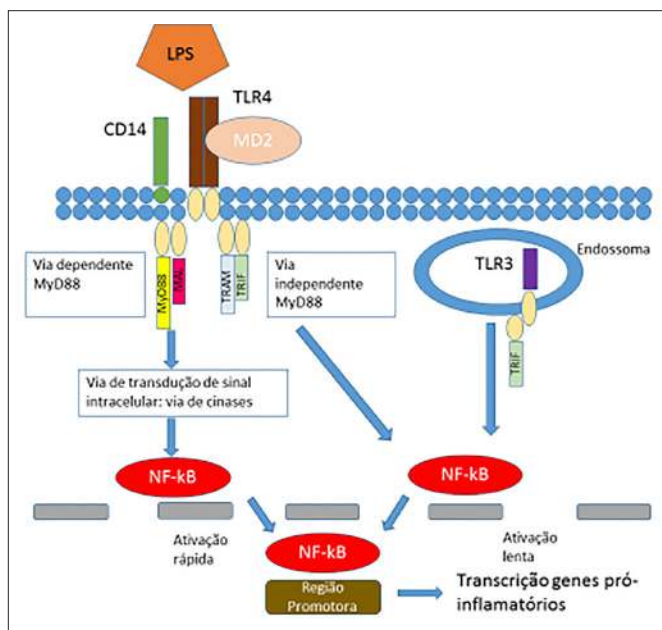
Os microrganismos possuem na sua estrutura padrões conservados, denominados de *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), que podem ser o lipopolissacarídeo (LPS), ou outros como peptidoglicano, lipopeptídeo e flagelina.^{4,6,11,16,17} Além disso, a agressão dos agentes patogénicos ao tecido permite a libertação de proteínas e mediadores como alarminas, sendo este grupo denominado de *damage-associated molecular pattern molecules* (DAMPs).^{4,6,10} Quer as PAMPs quer as DAMPs podem ligar-se a recetores na superfície do macrófago, denominado por *pattern recognition receptors* (PRR), que reconhecem estes padrões conservados.^{4,6,11} Os dois tipos de PRRs com funções importantes na fisiopatologia da sepsis são os *toll-like receptors* (TLR) e *nod-like receptors* (NLR) que, após ativação da sinalização intracelular por diferentes mediadores, ativam o *nuclear factor-kappaB* (NF- κ B), um complexo proteico que desempenha inúmeras funções de entre as quais a transcrição de genes de mediadores pró-inflamatórios.^{4,6,7,11,16,18}

Toll-like receptors (TLR)

Os TLR são constituídos por ectodomínios, responsáveis pelo reconhecimento dos padrões conservados dos microrganismos, e por domínios intracelulares recetores toll-interleucina 1 (TIR), que fazem a transmissão do sinal e ativam a transcrição de mediadores inflamatórios.^{6,19} A maioria dos TLR necessitam de interação com outra(s) moléculas para a transdução do sinal como por exemplo homodímeros *toll-like receptor 4* (TLR 4) para sinalizar eficazmente através deste recetor (Figura 1).^{6,16}

Diferentes recetores TLR apresentam diferente localização no macrófago de acordo com a sua função, pelo que o TLR 4 se localiza na superfície da célula para com maior facilidade contactar com o material microbiano.^{6,16}

A família TLR apresenta diferentes vias de sinalização intracelular, sendo a mais frequente a que o faz via proteína My D88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) mas que pode ser também via *toll receptor domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF) quando a sinalização é feita pelo *toll-like receptor 3* (TLR 3).¹⁹ Há também a via *toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein* (TIRAP) que conecta o TLR 2 e o TLR 4 ao MyD88 e a via *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) que une o TLR 4 ao TRIF.^{16,19}



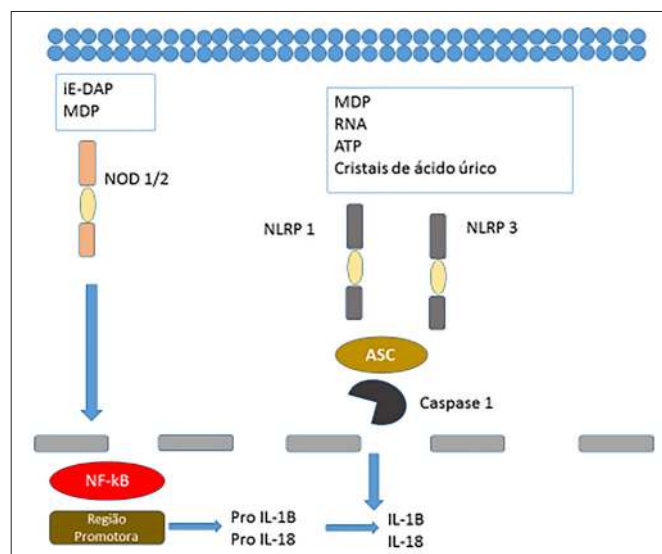
LPS: Lipopolissacarídeo; MAL: MyD88-adapter-like; MyD88: Myeloid differentiation primary response gene 88; NF-κB: Nuclear factor-κappaB; TLR-3: Toll-like receptor 3; TLR-4: Toll-like receptor 4; TRAM: TRIF-related adaptor molecule; TRIF: Toll Receptor domain-containing adapter-inducing interferon-β. (Adaptado de Kendrick SW, Jones DJ. Mechanisms of Innate Immunity in Sepsis. In: Baudouin S, editor. Sepsis. Competency-Based Critical Care: Springer London; 2008. p. 5-10)

Figura 1 – Via de sinalização desencadeada pelos TLRs

Concretamente em relação à sepsis e sendo que o LPS é o indutor da resposta imune inata mais potente, este liga-se ao TLR 4 que, após formação de homodímero, requer a interação de outras moléculas como o CD14 e MD2 para a ativação efetiva do complexo recetor. Só após esta ativação é transmitido o sinal à proteína My D88 que recruta uma cadeia de cinases que culmina na translocação do NF-κβ para o núcleo, fosforilação e consequente transcrição de reguladores que ativem a transcrição de genes pró-inflamatórios.¹⁶

Nod-like receptors (NLR)

Os microrganismos que invadem o citoplasma são reconhecidos por PRRs citoplasmáticos como NLR e *retinoic acid-inducible gene-1* (RIG-I) *like receptors* (RLRs).^{6,19} Os NLRs são subcategorizados de acordo com os seus domínios N-terminais.⁶ Estes podem ser de dois tipos, ou *nucleotide-binding oligomerization domain* (NODs), NLRs que reconhecem fragmentos de peptidoglicano bacteriano, ou NLRPs, NLR com domínio de pirina N-terminal, que possuem uma molécula adaptadora central denominada *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain* (ASC) (Figura 2).^{6,19} Os NLRPs formam complexos multimoleculares denominados inflamassomas que ativam caspases e assim estimulam a libertação de citocinas pró-inflamatórias.^{6,10,19} Estes processos apresentam um equilíbrio muito delicado comprovado por estudos que comparam doentes críticos com e sem sepsis que demonstram que os doentes com sepsis apresentam menores níveis de mRNA de ASC e caspase 1 e,



ASC: Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain; ATP: adenosina trifosfato; iE-DAP: gamma-D-glutamyl-mesodiaminopimelic acid (peptidoglycan fragment); IL-1/18: Interleukine 1/18; MDP: muramyl dipeptide (peptidoglycan fragment); NLRP1/3: Nod-like receptor protein 1/3; NOD 1/2: Nucleotide-binding oligomerization domain 1/2; RNA: ribonucleic acid (Adaptado de: Opitz B, Eitel J, Meixenberger K, Suttrop N. Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. Thrombosis and haemostasis. 2009;102(6):1103-9.)

Figura 2 – Via de sinalização desencadeada pelos NLRs

assim, contribuem mais para o estado imunodeprimido dos mesmos.⁶ Contudo, a capacidade de ativação da inflamação e das caspases contribuiu também para as lesões multiorgânicas provocadas pela sepsis.^{4,6,10} As consequências benéficas ou não deste processo dependem da extensão e duração da ativação dos inflamassomas, sendo esta uma fronteira muito ténue.^{6,11}

Citocinas: mediadores e principais alvos da terapêutica imunomoduladora

Após a transdução do sinal desencadeado pela interação das PAMPs com os PRRs são libertadas inúmeras citocinas, pró e anti-inflamatórias, simultaneamente, dando o nome a este fenómeno de "tempestade de citocinas".^{4,6,11,12,14,15} Para além desta variabilidade de mediadores libertados na resposta do macrófago acresce ainda a variável de que diferentes doentes com sepsis apresentam diferentes perfis imunológicos, não havendo assim um estereótipo de resposta nesta síndrome, o que torna todo o processo ainda mais complexo e heterogéneo.^{4,11,13}

Uma vez que o macrófago é pedra angular na resposta da imunidade inata e as citocinas são moléculas efetoras por ele produzidas e essenciais à sua função, destacamos em seguida algumas destas moléculas que, além de implicação na fisiopatologia, tem vindo a ser usadas em ensaios por serem possíveis alvos terapêuticos (Tabela I).

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1)

TNF- α é uma proteína com origem maioritariamente em células imunes ativadas (como o macrófago) em resposta a diversos estímulos de entre os quais os infecciosos.^{11,20} O TNF- α é um mediador precoce desta cascata (libertado cerca de 30 minutos após o estímulo) e atua por via de recetores específicos como o *tumor necrosis factor receptor 1 e 2* (TNFR 1 e 2), conduzindo à consequente ativação de células imunes e de uma cascata de mediadores pró-inflamatórios. Além disso, o TNF- α exerce também ação no macrófago aumentando a sua produção, promovendo a sua ativação, diferenciação bem como a sua sobrevivência.¹¹

De forma semelhante, também a IL-1 é libertada por macrófagos ativados numa altura semelhante ao TNF- α , mas em menor quantidade, fazendo a sua sinalização também via dois recetores transmembranares, o *IL1-receptor type 1 e 2* (IL-1R1 e IL-1R2), que desencadeiam efeitos semelhantes.^{11,20}

Assim, o TNF- α e a IL-1 são importantes mediadores da ativação e amplificação das cascatas inflamatórias de forma autócrina e parácrina, pela ativação de macrófagos e estimulação para a secreção de outras citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores como radicais de oxigénio, originando complicações como a falência multiorgânica.^{11,21} Por ser maestro de toda esta cascata de produção de citocinas o TNF- α é considerado um dos mais importantes reguladores, a par da IL-1, que é também ela fulcral na regulação da inflamação.^{11,22}

Modelos experimentais animais comprovaram tudo isto pois o TNF- α e a IL-1 demonstraram ser capazes de causar uma síndrome semelhante ao choque séptico e revelaram estar envolvidos na patogénese da sepsis já que a administração de endotoxinas bacterianas resultava na produção e libertação destes mediadores na circulação sistémica com um importante poder pró-inflamatório.^{11,22,23}

Estas citocinas têm recetores solúveis e recetores antagonistas denominados *soluble tumor necrosis factor receptors* (sTNFR), IL-1R2 e *IL-1 receptor antagonist* (IL-1Ra) que modulam a atividade destas citocinas.²² Assim, verificou-se em experimentação animal com modelos de choque séptico que a administração de IL-1Ra aumentava a sobrevivência, sugerindo assim um possível papel terapêutico.^{5,11,22}

Então, o balanço entre as citocinas e os seus recetores parece um importante indicador de prognóstico e uma possível via de tratamento através dos seus inibidores.¹¹

Apesar de tudo, a maioria dos ensaios realizados com anticorpos monoclonais dirigidos ao TNF- α , com uso de sTNFRs, IL-1R1 e recetores IL-1 solúveis, em doentes com sepsis, falharam em mostrar diminuição na mortalidade, apesar dos resultados promissores em modelos experimentais de sepsis.^{5,11,21,24} Estes resultados foram obviamente inesperados na medida em que quer o TNF- α quer o IL-1 apresentam um papel fulcral na resposta pró-inflamatória.¹¹

Macrophage migration inhibitory factor (MIF)

O MIF pode ser libertado pela hipófise após a estimulação por endotoxinas como LPS, mas também pelos macrófagos e pela glândula supra-renal perante esse mesmo estímulo.^{11, 25-27} Esta citocina é considerada uma molécula pró-inflamatória tardia, contrariamente à maioria das citocinas que são libertadas numa fase precoce da resposta inflamatória.²⁸ Não só o LPS estimula a libertação deste mediador mas também o TNF- α , INF- λ e C5a são potentes indutores da sua secreção pelos leucócitos, que, após libertado, exerce então ação de citocina pró-inflamatória promovendo a resposta inata imune com ativação dos macrófagos.^{4,11,26}

O MIF exerce o seu efeito pró-inflamatório devido à ação da sua tautomerase, podendo também ainda induzir e amplificar a produção de outras citocinas pró-inflamatórias e aumentar a expressão de TLR 4.^{4,11,26} Em elevadas quantidades, inibe a apoptose dos macrófagos dependentes da p53 e estabelece uma resposta inflamatória sustentada.^{4,26} De facto, doentes com sepsis revelaram ter níveis aumentados de MIF que parecem condicionar uma maior severidade da doença e maior mortalidade.⁴

A deficiência do MIF leva a uma resposta diminuída ao LPS pela diminuição da expressão do TLR 4, condicionando assim uma diminuição dos níveis circulantes de TNF- α , por exemplo, e protegendo desta forma os modelos ratinhos de desenvolver choque séptico.^{6,25}

A neutralização do MIF ou a inibição da atividade da sua tautomerase promove uma diminuição da inflamação e um aumento da sobrevida mesmo sendo o início da terapêutica imunomoduladora pós início da doença.^{4,26}

Comparativamente com a terapia anti-TNF, a terapia anti-MIF parece não afetar a capacidade do hospedeiro combater a infeção causada por uma bactéria extracelular.²⁵

High mobility group box 1 (HMGB 1)

A HMGB 1, assim como o MIF, surge na fase mais tardia da resposta inflamatória.^{6,26,28} A sua principal fonte nos processos inflamatórios é o macrófago, mas também os neutrófilos, e pode ser induzida por outras citocinas pró-inflamatórias e agentes patogénicos.^{4,26,28} Este mediador encontra-se elevado na sepsis e promove a atividade de outros mediadores pró-inflamatórios como IL-1, funcionando também como um vetor inflamatório.^{5,6,26} A HMGB-1 interage também com o TLR-2 e 4 e, via NF- κ B, estimula a resposta inflamatória promovendo a destruição da barreira celular epitelial.^{4,6,26}

Em ratinhos com tratamento com anticorpos anti-HMGB 1 verificou-se uma diminuição da letalidade das endotoxinas e um aumento da taxa de sobrevivência em doentes com sepsis.^{4-6,24,26}

Sabe-se ainda que a ativação da via colinérgica anti-inflamatória inibe a secreção deste mediador, promovendo o aumento da sobrevida. Esta via para inibir a secreção de HMGB 1 pode ser uma nova janela na terapêutica que deve ser explorada.^{4,26}

TABELA I: CITOCINAS: MEDIADORES E PRINCIPAIS ALVOS TERAPÊUTICOS

CITOCINAS	ORIGEM	FUNÇÃO PRINCIPAL	POSSIVEL ALVO TERAPÊUTICO
Tumor necrosis factor alpha (TNF-α)	Células imunes ativadas (como o macrófago)	Ativação e amplificação das cascatas inflamatórias de duas formas: - Autócrina - Parácrina: ativação e estimulação de macrófagos para a secreção de outras citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores	Recetores solúveis e recetores antagonistas : <i>Soluble tumor necrosis factor receptors</i> (sTNFR), IL-1R2 e <i>IL-1 receptor antagonist</i> (IL-1Ra) para a antagonização da ação do TNF-α e do IL-1
Interleucina 1 (IL-1)			
Macrophage migration inhibitory factor (MIF)	Hipófise Macrófagos Glândula supra-renal	Efeito pró inflamatório: ação da sua tautomerase Indução e amplificação da produção de outras citocinas pró-inflamatórias (ativação dos macrófagos)	Neutralização do MIF ou inibição da atividade da sua tautomerase para a diminuição da atividade inflamatória
High mobility group box 1 (HMGB 1)	Macrófago Monócitos Neutrófilos	Promoção da atividade de outros mediadores pró-inflamatórios como IL-1 (função de vector inflamatório)	Anticorpos anti-HMGB 1 promovem a diminuição da letalidade das endotoxinas Ativação da via colinérgica anti-inflamatória inibe a secreção deste mediador
Interferão Gama (INF-λ)	Células NK, Th1 e células T CD8+ citotóxicas; Macrófago (indiretamente, através de citocinas por ele produzidas como o TNF-α, IL-12 e IL-18)	Mediador pró-inflamatório Imunorregulação	INF-λ para reversão da anergia dos monócitos (aumento do HLA-DR na superfície) em doentes com sepsis em fase imunossupressiva
Interleucina 6 (IL-6)	Macrófagos Células dendríticas Linfócitos	Ativação de linfócitos Ativação cascata de coagulação Ação pirogénica Respostas de fase aguda a estímulos inflamatórios Promoção da resposta anti-inflamatória	Deleção do gene IL-6 para proteção da mortalidade causada pela infeção e desenvolvimento de falência orgânica
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	Macrófagos Células T Células <i>Natural Killer</i> (NK)	Aumento da produção de neutrófilos, monócitos e macrófagos	GM-CSF para reversão da anergia dos monócitos (aumento do HLA-DR na superfície) em doentes com sepsis em fase imunossupressiva
OUTROS ALVOS RELACIONADOS COM AS CITOCINAS			
Programmed Death 1 (PD-1)	PD-1:	<i>Down regulation</i> dos linfócitos	Anticorpos anti-PD-1 e anti-PDL-1 para o restabelecimento da resposta imunitária e inibição a apoptose.
Programmed Death Ligand 1 (PDL-1)	linfócitos PDL-1: monócitos	Inibição da função do macrófago (indução de imunossupressão)	

Interferão Gama (INF- λ)

O INF- λ é maioritariamente produzido por células NK, Th1 e células T CD8+ citotóxicas, contudo, o macrófago através de citocinas por ele produzidas como o TNF α , IL-12 e IL-18 regula e estimula a produção do Interferão.^{5,11} Este mediador apresenta um importante papel imunorregulador na medida em que ratinhos sem capacidade de libertação de INF- λ eram mais suscetíveis à infeção e também a sua neutralização tornava-os mais resistentes ao desenvolvimento de choque séptico induzido pelo LPS.¹¹ Apesar disso, os níveis plasmáticos desta citocina não demonstraram ter relação com a severidade ou mortalidade da sepsis.^{5,11}

O uso de INF- λ na terapêutica permite a reversão da anergia dos monócitos (aumento do HLA-DR na superfície) e aumento da taxa de sobrevivência em doentes com sepsis em fase imunossupressiva.¹¹

Interleucina 6 (IL-6)

Citocina produzida maioritariamente por macrófagos de entre outras células como dendríticas e linfócitos, em resposta à estimulação por LPS ou por outras citocinas como TNF- α e IL-1.^{5,11} O IL-6 não induz por si só um quadro clínico semelhante à sepsis, contudo, os seus níveis estão elevados na sepsis e correlacionam-se com índices clínicos, existência de falência multiorgânica e choque séptico.¹¹ Este mediador induz o aumento de produção de PMNs, ativação de linfócitos, cascata de coagulação, exerce ação pirogénica e medeia respostas de fase aguda face a estímulos inflamatórios.^{5,11} Estudos em ratinhos demonstraram que a deleção do gene IL-6 protegia-os da mortalidade causada pela infeção e do desenvolvimento de falência orgânica.¹¹

Apesar destas funções da IL-6, esta tem também uma ação promotora da resposta anti-inflamatória, inibindo a libertação do TNF- α e IL-1 e, por sua vez, estimulando a libertação de citocinas anti-inflamatórias como IL-1Ra, sTNFRs, IL-10, TGF- β e cortisol.^{5,11}

O seu doseamento parece ser útil como indicador de prognóstico e de doentes que mais beneficiarão em iniciar rapidamente medidas de suporte, já que é considerada uma das citocinas com maior relação com a taxa de mortalidade na sepsis.^{5,20,29}

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)

O GM-CSF é uma glicoproteína secretada por macrófagos, de entre outras células como células T e *Natural Killer* (NK), que atua como uma citocina promovendo o aumento da produção de neutrófilos, monócitos e macrófagos.^{5,13}

O seu uso em doentes com sepsis em fase imunossupressiva, identificados pela diminuição da expressão do HLA-DR nos monócitos por exemplo, permitiu o restabelecimento da expressão normal de HLA-DR, aumento da libertação de TNF- α e uma diminuição das infeções nosocomiais graças à restituição da imunidade inata. Apesar disso, o seu uso ainda não demonstrou benefícios na mortalidade destes doentes.^{5,10,11,13}

Outros Alvos relacionados com as Citocinas

Programmed Death 1 (PD-1) e Programmed Death Ligand 1 (PDL-1)

O PD-1 encontra-se nos linfócitos e o PDL-1 nos monócitos. Em macrófagos de modelos de sepsis é induzida a expressão destes recetores que suprimem os linfócitos e inibem as funções do macrófago, induzindo portanto um estado de imunossupressão.^{13,14,30}

Sabe-se que em doentes com sepsis estas duas moléculas apresentam uma elevada expressão e que, o seu bloqueio, promove o aumento de citocinas inflamatórias e a diminuição da apoptose de células T.^{14,30} O seu bloqueio por anticorpos específicos melhora a sobrevida em ratinhos com sepsis em fase imunossupressiva, e este benefício aparenta ocorrer mesmo em fases mais tardias da sepsis.³⁰ De facto, o anticorpo dirigido contra estes recetores parece restaurar a resposta imunitária e inibir a apoptose.^{14,30}

Comparativamente com o tratamento com o anticorpo para INF- λ , a inibição do PD-1 e PDL-1 parece ser o melhor tratamento entre os dois na medida em que permite restabelecer a produção do Interferão e apresenta ainda outros benefícios noutras células imunológicas(11).rg.

/ As controvérsias na terapêutica da sepsis

A maioria dos estudos feitos nos 20 anos anteriores com o objetivo de aplicar terapêuticas imunomoduladoras na clínica falharam claramente, mantendo-se assim a elevada taxa de mortalidade desta síndrome.^{4,5,15,24} O *anti-toll like receptor 4* (TLR 4) *Eritoran Tetrasodium* falhou na fase III do ensaio clínico randomizado em mostrar melhoria do objectivo primário "mortalidade aos 28 dias por todas as causas" numa coorte de 2000 doentes com sepsis grave.^{4,28,31} Também a proteína C ativada recombinada, *Drotrecogin alfa*, foi retirada do mercado após falhar em demonstrar melhoria nos resultados num ensaio mundial.^{28,31} Este fármaco havia demonstrado num ensaio anterior melhoria na sobrevida, algo não confirmado num subsequente. De facto, estas consecutivas perdas de potenciais e promissores alvos terapêuticos levaram a comunidade científica a refletir sobre o que estaria então a falhar.^{10,31}

Em primeiro lugar, no desenho do ensaio clínico, é necessário ter em consideração a heterogeneidade dos doentes a incluir, uma vez que em estudos animais, estes constituem uma população homogénea, sem comorbilidades, ao invés do que sucede nos estudos com humanos.^{5,10,24,31} Ainda as variações genéticas e epigenéticas como mutações nos genes que codificam PRRs ou mediadores inflamatórios e os seus recetores introduzem variabilidade e podem ter consequências na resposta do hospedeiro.⁴ Para além disso, a classificação em sepsis, sepsis grave ou choque séptico, pode abranger doentes com níveis de gravidade bem diferentes e cada um com mecanismos

patofisiológicos específicos diferentes. Deste modo, esta generalização deve-se à falta de critérios específicos e reprodutíveis que permitam agrupar os doentes de acordo com os mecanismos específicos da doença e com o seu perfil imunológico para assim permitir a aplicação de terapêuticas específicas.^{10,31}

Em segundo lugar, quando se testam fármacos específicos que atuam numa tão complexa rede de resposta à infeção, seria necessário ajustar os tamanhos amostrais para conseguirem detetar discretos efeitos terapêuticos.^{5,31} Para além disso, o objetivo tipicamente usado no final da fase II que é a "mortalidade por todas as causas aos 28 dias" parece não ser a melhor medida de sucesso a usar pois, aos 28 dias, muitos pacientes estão ainda hospitalizados e a evidência parece demonstrar que muitas das sequelas da sepsis são mais tardias que este *cut-off* temporal. Um objetivo mais tardio que conjugasse mortalidade com outras sequelas como físicas e cognitivas seria mais direcionado para o doente e até poderia alterar o rumo de desenvolvimento de alguns fármacos.^{5,24,31}

Em terceiro lugar, as unidades de cuidados intensivos e os serviços de emergência médica obtêm excelentes resultados com o suporte dos doentes e no controlo da fase inicial da infeção (algo que não parece estar bem reproduzido nos modelos animais), o que demonstra a maior necessidade de direcionar a atenção para a resposta tardia à infeção.^{10,31} Além disso, a maioria das citocinas são mediadoras precoces da inflamação cuja janela temporal em que estão elevadas é curta, retornando ao basal após poucas horas, daí que quando intervencionado o doente o tratamento seja ineficaz.^{5,11,24} Então, mais uma vez, talvez o foco da investigação devesse estar mais voltado para a resposta tardia da sepsis e seus mediadores, bem como para as fases de recuperação, iniciando a terapêutica em doentes com características imunológicas específicas e que evidenciem disfunção orgânica, de forma a promover a recuperação precoce e a diminuição da morbilidade e mortalidade tardias.³¹

De salientar que deve ainda ser abandonada a conceção de que um único mediador pode ser a chave da fisiopatologia da sepsis e a sua neutralização o tratamento, na medida em que atualmente sabemos que se trata de uma síndrome complexa, dinâmica e com grande variabilidade e heterogeneidade nos seus constituintes.^{4,5,24,28}

Por fim, seria importante estudar a farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos no que diz respeito à sua ação no sistema imune do hospedeiro.^{5,24,31}

De facto, o macrófago e os mediadores por ele libertados são importantes intervenientes na fisiopatologia da sepsis e podem ser importantes alvos terapêuticos. Contudo, a correta e adequada aplicação deste tipo de terapêuticas imunodirigidas necessita do recurso a ferramentas como biomarcadores que permitam de forma rápida e fiel indicar-nos qual o exato perfil imunológico do

doente.^{24,31} Sabendo que, dada a complexidade desta doença, a utilização de um único biomarcador dificilmente será possível e que o ideal para a avaliação do estado imune do doente seria juntar um ensaio fenotípico (HLA-DR e PDL-1), ensaio funcional (TNF no sangue) e ensaio genómico, com inclusão de marcadores do estado anti e pró-inflamatório, torna-se imprescindível refletir sobre possíveis novos biomarcadores que ultrapassem as limitações dos atualmente usados, Pro-calcitonina e Proteína C Reativa (PCR), e permitam servir da melhor forma os propósitos supracitados.^{13,20,28}

A ausência destes biomarcadores é uma importante lacuna no conhecimento atual e uma possível forte razão para o insucesso verificado nas terapêuticas imunomoduladoras até aos dias de hoje. É ainda um alerta para a comunidade médica de que a abordagem terapêutica nestes doentes deve ser voltada para uma prática mais individualizada, pois só assim será possível aplicar fármacos tão específicos e dirigidos, bem como a sua monitorização.^{5,24,28} Todos os outros pontos realçados são também importantes e a ter em consideração em ensaios futuros de forma a ser possível uma reviravolta no panorama dos últimos anos dos ensaios farmacológicos.

Assim, dado que o macrófago é a figura mais proeminente na mediação da resposta imune inata e é sobre ele e sobre os mediadores por ele libertados que atuam as terapêuticas imunomoduladoras apresentadas, sugere-se, em seguida, o estudo de biomarcadores que estão também directamente relacionados com o macrófago (moléculas expressas como o *Human leukocyte antigen-DR*, HLA-DR, e o PDL-1 ou libertadas como o rácio IL-10:TNF- α) para assim permitirem caracterizar de forma correta e fiel o estado imunológico do doente.

Biomarcadores

Human leukocyte antigen-DR (HLA-DR)

O HLA-DR é um recetor de superfície celular pertencente ao Complexo Major de Histocompatibilidade II (MHC II).²⁰

A imunodepressão cursa com uma diminuição da expressão de HLA-DR na superfície do macrófago o que condiciona uma menor atividade destas células, sendo portanto um bom marcador de anergia do monócito e de estados de imunodepressão.^{5,13,20,24} Esta diminuição de HLA-DR condiciona uma diminuição da apresentação antigénica e um aumento do risco de infeções nosocomiais e morte.^{5,10,13,24} Assim, após este resultado é possível orientar a terapêutica do doente para alvos imunológicos que estimulem a libertação de mediadores pró-inflamatórios.

IL-10:TNF- α

De acordo com estudos realizados, alguns dos doentes que morrem de sepsis encontram-se em imunossupressão marcada com uma grande diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias.^{12,13,30}

Na tentativa de explicar esta imunossupressão do doente séptico considerou-se a hipótese de haver um "mecanismo de tolerância a endotoxinas" onde a exposição contínua ao LPS despoletava uma diminuição da expressão dos recetores de superfície, uma desregulação dos mecanismos de transdução de sinal e uma diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias.^{7,9,13} Contudo, verificou-se que a atividade dos macrófagos não ficava totalmente suprimida havendo maioritariamente uma transdução de sinal no sentido de produção de mediadores anti-inflamatórios, sendo um dos principais intervenientes o IL-10.^{9,13} O tratamento com anticorpos anti-IL10 em estudos com ratinhos promoveram a diminuição da tolerância imunológica e a decorrente imunodepressão com uma diminuição da mortalidade.¹³ A este conceito novo que complementa o mecanismo de tolerância a endotoxinas denominou-se "reprogramação do monócito".⁷

Estudos com IL-10 permitiram perceber que aparentemente a IL-10 e o TNF- α se regulam mutuamente por mecanismos de *feedback* negativo (9). Assim, a relação entre ambos pode ser um bom biomarcador para aferir se o doente está com um fenótipo imunológico a pender para o lado pró ou anti-inflamatório e assim adequar a terapêutica.¹²

PD-1 e PDL-1

Como referido anteriormente, em macrófagos de modelos de sepsis há indução da expressão do PD-1 e do PDL-1, sendo que a elevada expressão destas molécula condiciona um estado de imunossupressão.^{13,14} Assim, a quantificação de PD-1 e PDL-1 pode constituir um bom biomarcador para a instituição de terapia com anticorpos específicos para estes recetores mas também para identificar doentes em imunodepressão.¹³

/ Conclusão

O macrófago assume um importante papel na fisiopatologia da sepsis através da regulação da resposta imune inata do hospedeiro a uma infeção. De entre os mediadores libertados pelo macrófago, destaque para o TNF- α e IL-1, MIF, HMGB 1, INF- λ , IL-6, GM-CSF e os recetores PD-1 e PDL-1, que, para além de importância na resposta desencadeada, são apontados como possíveis alvos de terapêutica imunomoduladora. Apesar de ser promissor este tipo de terapêutica, os insucessos dos ensaios clínicos revelaram limitações na aplicação destes fármacos, concluindo-se que, de entre outras medidas, é pertinente identificar e adotar biomarcadores fideis que espelhem o estado imunológico do doente. Uma vez que a atividade do macrófago reflete o funcionamento da imunidade inata, o recurso a moléculas relacionadas com esta célula como a quantificação de HLA-DR, rácio IL-10:TNF- α e quantificação do PD-1 e PDL-1 podem ser usados como biomarcadores. De facto, considera-se que só assim será possível a prática de uma medicina individualizada que permita a correta e dirigida aplicação deste tipo de tratamento que é tão específico mas que atua numa complexa rede inflamatória.

/ Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor António Sarmento pela grande ajuda na realização deste trabalho e inspiração para a importância deste tema.

/ Bibliografia

1 World Sepsis Day Head Office, Global Sepsis Alliance, Center for Sepsis Control & Care. Fact Sheet Sepsis-stop sepsis, save lives [Internet]. Germany: World Sepsis Day; Available from: http://www.world-sepsis-day.org/CONTENTPIC/2015_WSD_FactSheet_long_English.pdf.

2 Saúde D-Gd. Criação e Implementação da Via Verde de Sépsis (VVS). Circular normativa Nº: 01/DQS/DQCO. Direção-Geral de Saúde [Internet]. 2010 Jan 06. Disponível em: <http://www.portaldasaude.pt/NR/rdonlyres/051D4394-95FA-419F-98DB-7AEED26D1E3E/0/i012305.pdf>

3 Povaia PR, Carneiro AH, Ribeiro OS, Pereira AC. Influence of vasopressor agent in septic shock mortality. Results from the Portuguese Community-Acquired Sepsis Study (SACiUCI study). *Crit Care Med*. 2009;37(2):410-6.

4 Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(10):776-87.

5 Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, Ali MM, McGuire F, Nagarkatti PS, et al. Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis. *In Vivo*. 2013;27(6):669-84.

6 Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence*. 2014;5(1):36-44.

7 Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Monocytes/macrophages and sepsis. *Crit Care Med*. 2005;33(12 Suppl):S506-9.

8 Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*. 2016;315(8):801-10.

9 Ellaban E, Bolgos G, Remick D. Selective macrophage suppression during sepsis. *Cell Immunol*. 2004;231(1-2):103-11.

10 Angus DC, van der Poll T. Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med*. 2013;369(9):840-51.

- 11 Schulte W, Bernhagen J, #xfc, rgen, Bucala R. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—An Updated View. *Mediators of Inflammation*. 2013;2013:16.
- 12 Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis*. 2000;181(1):176-80.
- 13 Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(12):862-74.
- 14 Zhang Y, Zhou Y, Lou J, Li J, Bo L, Zhu K, et al. PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. *Crit Care*. 2010;14(6):R220.
- 15 Johnson DW, Kalil AC. Is Interleukin-1 Receptor Blockade Ready for Prime Time in Patients With Severe Sepsis and Macrophage Activation Syndrome?*. *Crit Care Med*. 2016;44(2):443-4.
- 16 Kendrick SW, Jones DJ. Mechanisms of Innate Immunity in Sepsis. In: Baudouin S, editor. *Sepsis. Competency-Based Critical Care*: Springer London; 2008. p. 5-10.
- 17 Bellingan G. Inflammatory cell activation in sepsis. *Br Med Bull*. 1999;55(1):12-29.
- 18 Adib-Conquy M, Adrie C, Moine P, Asehnoune K, Fitting C, Pinsky MR, et al. NF-kappaB expression in mononuclear cells of patients with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(5):1877-83.
- 19 Opitz B, Eitel J, Meixenberger K, Suttrop N. Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. *Thromb Haemost*. 2009;102(6):1103-9.
- 20 Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2013;50(1):23-36.
- 21 Murray MJ, Coursin DB. Multiple organ dysfunction syndrome. *Yale J Biol Med*. 1993;66(5):501-10.
- 22 Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*. 1997;112(6 Suppl):321s-9s.
- 23 Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavallion JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest*. 1991;88(5):1747-54.
- 24 Cohen J, Vincent JL, Adhikari NK, Machado FR, Angus DC, Calandra T, et al. Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(5):581-614.
- 25 Froidevaux C, Roger T, Martin C, Glauser MP, Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor and innate immune responses to bacterial infections. *Crit Care Med*. 2001;29(7 Suppl):S13-5.
- 26 Chen XH, Yin YJ, Zhang JX. Sepsis and immune response. *World J Emerg Med*. 2011;2(2):88-92.
- 27 Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, et al. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med*. 1999;189(2):341-6.
- 28 Cho SY, Choi JH. Biomarkers of Sepsis. *Infect Chemother*. 2014;46(1):1-12.
- 29 Miguel-Bayarri V, Casanoves-Laparra EB, Pallas-Beneyto L, Sancho-Chinesta S, Martin-Osorio LF, Tormo-Calandin C, et al. Prognostic value of the biomarkers procalcitonin, interleukin-6 and C-reactive protein in severe sepsis. *Med Intensiva*. 2012;36(8):556-62.
- 30 Goyert SM, Silver J. Editorial: PD-1, a new target for sepsis treatment: better late than never. *J Leukoc Biol*. 2010;88(2):225-6.
- 31 Angus DC. The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board? *Jama*. 2011;306(23):2614-5.