



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE INTERLEUCINAS E
MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E DE PROGNÓSTICO EM PACIENTES
PORTADORES DE SEPSE**

ROMÉRIO ALENCAR DE OLIVEIRA FILHO

RECIFE, 2016.

ROMÉRIO ALENCAR DE OLIVEIRA FILHO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE INTERLEUCINAS E
MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E DE PROGNÓSTICO EM PACIENTES
PORTADORES DE SEPSE**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Aplicada à Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito para a obtenção do título
de Mestre em Biologia Aplicada à
Saúde.

Orientador: Dr. José Luiz de Lima Filho

Co-orientadora: Dra. Rosângela Ferreira Frade de Araújo

Departamento de Bioquímica – CCB

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

1 Oliveira Filho, Romério Alencar de

Associação entre polimorfismos genéticos de interleucinas e marcadores de inflamação e de prognóstico em pacientes portadores de sepse/ Romério Alencar de Oliveira Filho– Recife: O Autor, 2016.

74 folhas : il., fig., tab.

Orientador: José Luiz de Lima Filho

Coorientadora: Rosângela Ferreira Frade de Araújo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, 2016.

2 Inclui referências e anexos

1. Polimorfismo (genética) 2. Interleucinas 3. Septicemia I. Lima Filho, José Luiz de (orientador) II. Araújo, Rosângela Ferreira Frade de (coorientadora) III. Título

576.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-150

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dra. Florisbela Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
APLICADA À SAÚDE**

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

Parecer da comissão examinadora da dissertação de mestrado de

ROMÉRIO ALENCAR DE OLIEVIRA FILHO

Associação entre polimorfismos genéticos de interleucinas e marcadores de inflamação e de prognóstico em pacientes portadores de sepse.

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera o candidato **ROMÉRIO ALENCAR DE OLIEVIRA FILHO** como:

APROVADO

Recife, 29 de fevereiro de 2016.

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Orientador
Departamento de Bioquímica
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto

Membro Interno
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Profa. Dra. Dilênia de Oliveira Cipriano Torres

Membro Externo
Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco
Universidade de Pernambuco

*Dedico este trabalho aos meus avós, Francisco e Maria,
pelo verdadeiro amor e ensinamentos.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que está sempre presente em minha vida, iluminando e guiando meus caminhos, pelos obstáculos superados e pelas bênçãos recebidas.

À Prof^a Dra. Rosângela Frade, pela calma, sabedoria e orientação durante todos estes anos.

Ao Prof^o Dr. José Luiz, pela paciência e pelos ensinamentos. Levá-los-ei por toda a vida.

Aos meus avós, Francisco e Maria, por todo amor, apoio, incentivo. Obrigada por sempre acreditarem que eu seria capaz!

Ao querido André Lima, por todo incentivo, por todo amor e compreensão.

À minha família recifense, Nadja, Kaliny, Júlia, Marcos e João, que me acolheram tão bem e me mostrar a verdadeira essência da família.

Ao Dr. Fabrício Souto, que me ajudou muito em meus experimentos de citometria. Sempre pronto a ajudar! Muito obrigado!

À Dra. Dilênia, pelas amostras e dados utilizados no projeto.

À Sandra, técnica do laboratório, pelo apoio diário e momentos de diversão.

À todos os companheiros do laboratório de Prospecção Molecular e Bioinformática do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, em especial à prof. Danielly Bruneska.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro à pesquisa e a Capes pela concessão da bolsa.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, cujos nomes não foram citados, mas sabem da sua importância para que este dia chegasse.

Muito obrigado a todos!

“Toda mudança positiva - todo salto para um nível maior de energia e consciência - envolve um ritual de passagem. A cada subida para um degrau mais alto na escada da evolução pessoal, devemos atravessar um período de desconforto, de iniciação. Eu nunca conheci uma exceção.”

Dan Millman

RESUMO

DE OLIVEIRA FILHO, R. A. **Associação entre polimorfismos genéticos de interleucinas e marcadores de inflamação e de prognóstico em pacientes portadores de sepse.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

A sepse, apesar do melhor entendimento de sua fisiopatologia e da aplicação de novos recursos terapêuticos, diferentes parâmetros clínicos e laboratoriais podem ser associados à mortalidade de pacientes criticamente enfermos, dentre eles as citocinas, como por exemplo, as interleucinas (ILs). Concentrações basais mais elevadas de IL-6 e IL-10, além de polimorfismos genéticos nesses genes estão associadas à evolução desfavorável de disfunção orgânica. O objetivo deste estudo foi avaliar os polimorfismos genéticos das ILs 6 (-634C>G) e 10 (-1082G>A), correlacionando-os aos níveis de biomarcadores inflamatórios e escores prognósticos (APACHE II e SOFA) em pacientes diagnosticado com sepse na UTI do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco, Recife. Um total de 120 pacientes (incluindo 70 pacientes com sepse e 50 controles) foram analisados. Os níveis de citocinas no plasma foram determinados por citometria de fluxo com kit CBA Th1/Th2. Os Polimorfismos IL10-1082G>A e IL6-634C> G foram estudados por meio de análise PCR-RFLP. Os escores de prognóstico e os níveis de interleucinas foram comparados entre os grupos de pacientes com diferentes genótipos IL6 e IL10. Entre os pacientes incluídos no estudo, o grupo com sepse mostrou pontuações mais altas no APACHE II e SOFA e maiores níveis séricos de IL-6 e IL-10. Os polimorfismos avaliados nas regiões promotoras IL6 e IL10 não tiveram efeito sobre os níveis séricos destas citocinas e não estavam associados à sepse ou com os escores, exceto o alelo G de IL10(-1082) que foi associado com valor de SOFA superior a 7. Portanto, o APACHE II e SOFA foram bons indicadores de mortalidade. Níveis mais elevados de IL-6 e IL-10 foram observados nos pacientes com sepse. Neste estudo, embora o polimorfismo IL6 (-634C> G) não demonstrou estar envolvido no processo de agravamento da sepse, o alelo G do gene IL10 (-1082G>A) agiu como um fator de risco quando relacionado com o escore SOFA. No entanto, como esses genes são muito polimórficos, é necessário estudos mais amplos de associação de escores prognósticos incluindo outros polimorfismos.

Palavras-chave: polimorfismos, interleucinas, sepse, inflamação, prognóstico.

ABSTRACT

DE OLIVEIRA FILHO, R. A. **Association between genetic polymorphisms of interleukins and inflammation and prognosis markers in patients with sepsis.** Dissertation (Master's degree) – Post-Graduate Program in Biology Applied to Health, Federal University of Pernambuco, Recife, 2016.

Sepsis, despite the better understanding of its pathophysiology and application of new therapeutic resources, different clinical and laboratory parameters can be associated with mortality in critically ill patients, including cytokines, such as interleukins (ILs). Higher baseline levels of IL-6 and IL-10, besides genetic polymorphisms in these genes are associated with unfavorable outcomes organ dysfunction. The aim of this study was to evaluate the genetic polymorphisms of ILs 6 (-634C>G) and 10 (-1082G>A), correlating the levels of inflammatory biomarkers and prognostic scores (APACHE II and SOFA) in patients diagnosed with sepsis in Ready ICU Cardiac Emergency of Pernambuco, Recife. A total of 120 patients (including 70 patients with sepsis and 50 controls) were analyzed. Levels of cytokine in plasma were determined by flow cytometry with the CBA Th1 / Th2 kit. The polymorphisms IL10-1082G>A and IL6-634C>G were studied by PCR-RFLP analysis. The prognostic scores and interleukins levels were compared between groups of patients with different genotypes IL6 and IL10. Among the patients included in the study, the group with sepsis showed higher scores on the APACHE II and SOFA and higher serum levels of IL-6 and IL-10. Polymorphisms evaluated in the promoter regions of IL-6 and IL-10 had no effect on serum levels of these cytokines and were not associated with sepsis or with the scores except the G allele of IL-10 (-1082) who was associated with SOFA value than 7. Therefore, the APACHE II and SOFA scores were good indicators of mortality. Higher levels of IL-6 and IL-10 were observed in patients with sepsis. In this study, although the IL6 polymorphism (-634C>G) has not demonstrated to be involved in the process of worsening sepsis, the G allele of the IL10 gene (-1082G>A) acted as a risk factor when related to the SOFA score. However, as these genes are very polymorphic, we need larger studies of association of prognostic scores including other polymorphisms.

Keywords: polymorphisms, interleukins, sepsis, inflammation, prognosis.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fisiopatologia da sepse	29
Figura 2. Localização do gene IL6.	34
Figura 3. Localização do gene IL10	34
Figure 1 - Article. Interleukins levels in patients with sepsis and controls.	52
Figure 2 - Article. Correlation between APACHE II and SOFA scores and mortality.....	53
Figure 3 - Article. Association between IL6 and IL10 levels and risk scores.....	54
Figure 4 - Article. Distribution of IL6 e IL10 level by genotypes.	56

LISTA DE QUADROS E TABELAS

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Definições dos estágios da sepse.	25
Quadro 2. Critérios de diagnóstico da sepse após infecção documentada ou suspeitada.....	26
Table 1 - Article. IL6 and IL10 promoter polymorphisms in patients with sepsis (n = 70) and controls (n = 50).	55
Table 2 - Article. IL6 and IL10 promoter polymorphisms considering the prognosis score APACHE II.	57
Table 3 - Article. IL6 and IL10 promoter polymorphisms considering the prognosis score SOFA.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ACCP	<i>American College of Chest Physician</i>
APACHE	<i>Acute Physiology And Chronic Health Evaluation</i>
BASES	<i>Brazilian Sepsis Epidemiological Study</i>
CBA	<i>Cytokine Beads Array</i>
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
IL	Interleucina
INF	Interferon
LODS	<i>Logistic Organ Dysfunction System</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MODS	<i>Multiple Organ Dysfunction Score</i>
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio
PAS	Pressão arterial sistêmica
PCR	Proteína C reativa
PCR-RFLP	<i>Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
pH	Potencial hidrogênico
PROCAPE	Pronto-socorro Cardiológico de Pernambuco

RNI	Razão normatizada internacional
SAPS	<i>Simplified Acquired Physiological Score</i>
SCCM	<i>Society of Critical Care Medicine</i>
SDMO	Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOFA	<i>Sepsis-related Organ Failure Assessment</i>
TNF	Fator de necrose tecidual
TTP	Tempo de tromboplastina parcial
UTI	Unidade de terapia intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1	SEPSE.....	24
2.1.1	<i>Considerações gerais e definições</i>	<i>24</i>
2.1.2	<i>Epidemiologia.....</i>	<i>27</i>
2.1.3	<i>Patogênese.....</i>	<i>28</i>
2.2	MARCADORES DE PROGNÓSTICO	29
2.3	IMUNOSSUPRESSÃO	31
2.4	CITOCINAS ENVOLVIDAS NA SEPSE	32
2.5	POLIMORFISMOS DE CITOCINAS E SEPSE	33
3	REFERÊNCIAS	36
4	OBJETIVOS.....	43
4.1	<i>Objetivo geral</i>	<i>43</i>
4.2	<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>43</i>
5	ARTIGO	45
5.1	ABSTRACT.....	46
5.2	INTRODUCTION	46
5.3	MATERIAL & METHODS	48
5.4	RESULTS AND DISCUSSION	50
5.5	CONCLUSION.....	58
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
7	PERSPECTIVAS	66
	ANEXOS.....	68

1 INTRODUÇÃO

A sepse, que é compreendida como uma inflamação sistêmica grave em resposta à invasão de agentes patógenos, caracteriza-se por um desbalanceamento do sistema imune, mediada pela liberação exacerbada de diversos mediadores inflamatórios e que pode evoluir para choque, levando a danos em vários órgãos e até mesmo ao óbito (CLARK et al, 2016).

A sepse representa a principal causa de mortalidade em unidades de terapia intensiva (UTIs). A taxa de mortalidade de todos os episódios sépticos (sepse grave, choque séptico e síndrome de disfunção de múltiplos órgãos) é de 30 a 50% (FLEISCHMANN et al., 2016). No entanto, apesar do aumento de pesquisas sobre a resposta inflamatória e a utilização de novas drogas, a mortalidade de sepse não diminuiu nas últimas décadas (ALBERTI et al., 2002). Isto sugere que é de extrema importância identificar mediadores relevantes responsáveis pelas alterações fisiológicas durante a sepse, a fim de desenvolver e orientar novas abordagens terapêuticas (LEVER et al., 2007).

Citocinas, proteases, mediadores lipídicos, substâncias gasosas, peptídeos vasoativos e marcadores de estresse celular desempenham um importante papel na fisiopatologia da sepse. Várias moléculas de adesão e quimiocinas sequestram e ativam os neutrófilos para os órgãos-alvo, aumentando ainda mais o dano inflamatório ao tecido (HAN-OH et al, 2016). Embora as substâncias antiinflamatórias controlem a produção de mediadores pró-inflamatórios, a modulação prolongada da resposta imune pode causar a susceptibilidade do hospedeiro às infecções, refletindo um enorme desafio para o desenvolvimento eficaz de uma terapia clínica contra a sepse (BAUER et al., 2016).

Citocinas são amplamente avaliadas como potenciais biomarcadores na sepse, mas infelizmente nenhuma delas possui especificidade ou sensibilidade suficiente para serem empregadas rotineiramente de forma isolada na prática clínica e identificar um prognóstico desfavorável (OSUCHOWSKI et al., 2006). O uso de escores, como o APACHE II e o SOFA, como instrumento de prognóstico de mortalidade é bastante útil. Embora alguns estudos relatarem êxito na utilização do APACHE II em pacientes admitidos à UTI (CHAWLA et al., 2007; HO, 2007), Lundeberg et al (1998) não conseguiram comprovar a eficácia do APACHE II para o prognóstico da mortalidade de pacientes com sepse. Isto sugere que o

resultado na sepse além de marcadores biológicos e clínicos, pode haver um forte componente genético envolvido no desenvolvimento de tal doença.

A análise do genoma humano tem sugerido o uso da informação genética como uma ferramenta complementar de prognóstico para muitas doenças humanas, incluindo a sepse (COLLINS et al., 2003). Assim inúmeros estudos de SNPs envolvendo os genes das interleucinas 6 e 10 têm sido desenvolvidos, uma vez que níveis elevados dessas interleucinas estão associados a um pior prognóstico em diversas doenças de caráter inflamatório (FISHMAN et al., 1998; HOLMES et al., 2003; YIN et al., 2013).

Assim, para entender a variabilidade no desenvolvimento da sepse e os resultados clínicos dos pacientes, o objetivo deste trabalho foi analisar os polimorfismos genéticos na região promotora -634G>C da IL6 e -1082A>G da IL10 e compará-los com os marcadores inflamatórios e de prognóstico em pacientes admitidos à UTI do Hospital Cardiológico de Pernambuco – PROCAPE.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SEPSE

2.1.1 Considerações gerais e definições

O conceito de sepse e suas variadas graduações foram definidos durante uma reunião da Sociedade de Terapia Intensiva Americana em 1991, pois a identificação do quadro real era imprecisa, o que dificultava o correto diagnóstico e a instauração de uma terapia precoce (*American College of Chest Physician – ACCP e a Society of Critical Care Medicine - SCCM*) (Quadro 1).

Os termos como infecção, bacteremia, SIRS (síndrome de resposta inflamatória sistêmica), sepse, sepse grave, choque séptico e síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO) foram regulamentados, permitindo o esclarecimento dos estágios da doença por médicos e pesquisadores. Dessa forma, sepse, do grego *sepsin* (putrefação de matérias ou tecidos orgânicos) é definida como um processo infeccioso grave desencadeador de uma intensa resposta inflamatória sistêmica, que medeia lesões teciduais, onde a disfunção orgânica múltipla representa sua expressão mais grave (HOTCHKISS *et al.*, 2013; BOOMER, 2011). As manifestações clínicas e os critérios para diagnóstico estão representados no Quadro 2.

Quadro 1. Definições dos estágios da sepse.

Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS): Resposta inflamatória sistêmica a uma variedade de insultos clínicos graves, como queimaduras e pancreatite, que ocorre, necessariamente, na ausência de infecção. A resposta é acompanhada por duas ou mais das seguintes condições: ▪ Temperatura > 38°C ou < 36°C ▪ Frequência cardíaca > 90 batimentos/min. ▪ Frequência respiratória > 20 movimentos/min. ou PaCO₂ < 32 torr (<4,3 KPa) ▪ Leucócitos < 4.000 ou > 12.000 células/mm³ ou > 10% formas imaturas
Infecção: Fenômeno microbiano caracterizado por uma resposta inflamatória reacional à presença de microrganismo ou à invasão de tecido normalmente estéril àqueles organismos.
Sepse: É a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica decorrente de infecção, mesmo que o foco infeccioso seja apenas suspeitado.
Sepse Grave: Sepse associada à disfunção orgânica, hipoperfusão ou hipotensão. Hipoperfusão e anormalidades da perfusão podem incluir, mas não estão limitadas a acidose láctica, oligúria ou alteração aguda do estado mental, entre outras.
Choque Séptico: Estado de falência circulatória aguda caracterizada pela persistência de hipotensão arterial, sendo hipotensão definida como PA (pressão arterial) sistólica < 90 mmHg ou redução de > 40 mmHg da linha de base, ou PAM (pressão arterial média) < 60mmHg, a despeito de adequada reposição volêmica, na ausência de outras causas de hipotensão.
Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO): Presença de disfunção orgânica (pulmonar, cardíaco, renal, entre outros) em pacientes enfermos, nos quais a homeostase não pode ser mantida sem intervenção.

Quadro 2. Critérios de diagnóstico da sepse após infecção documentada ou suspeitada.

Variáveis gerais
• Febre (temperatura central > 38,3°C) • Hipotermia (temperatura central < 36°C) • Frequência cardíaca > 90 bpm ou mais de 2 desvios-padrões acima do normal • Taquipnéia • Alterações sensoriais • Edema significativo ou balanço hídrico positivo • Hiperglicemia na ausência de diabetes
Variáveis inflamatórias
• Leucocitose: contagem de leucócitos totais > 12.000 células/mm³ de sangue • Leucopenia: contagem de leucócitos totais < 4.000 células/mm³ de sangue • Contagem de leucócitos normais com mais de 10% de células imaturas • Proteína C reativa no plasma > 2 desvios-padrões acima do valor normal • Procalcitonina plasmática > 2 desvios-padrões acima do valor normal
Variáveis hemodinâmicas
• Hipotensão arterial (PAS<90mmHg, PAM<70mmHg, ou redução da PAS>40mmHg em adolescentes, ou PAS/PAM< 2 desvios-padrões abaixo do valor normal para a idade) • Saturação de oxigênio venoso misto > 70% (não válido para crianças) • Índice cardíaco > 3,5l/min (não válido para crianças)
Variáveis de disfunção de órgãos
• Hipoxemia arterial (PaO₂ / FiO₂ < 300 sem pneumonia) • Oligúria aguda (diurese < 0,5 ml/kg hora) • Creatinina com aumento > 0,5 mg/dl • Alterações de coagulação (RNI>1,5 ou TTP>60s) • Íleo (ausência de ruídos hidroaéreos) • Trombocitopenia (contagem de plaquetas < 100.000/mm³ sangue) • Hiperbilirrubinemia (bilirrubina total>4mg/dL)
Variáveis de perfusão tecidual
• Hiperlactatemia (> 1 mmol/L) • Enchimento capilar ou moteamento

BPM: batimentos por minuto; PAS: pressão arterial sistólica; PAM: pressão arterial média; PaO₂: pressão parcial de oxigênio; FiO₂: fração inspirada de oxigênio; RNI: razão normatizada internacional; TTP: tempo de tromboplastina parcial (Adaptada de LEVY, 2003).

2.1.2 Epidemiologia

Dentre todas as doenças que acometem pacientes críticos, a sepse é considerada a principal causa de morte nas UTIs e uma das principais causas de morte em geral nos EUA. A sepse é caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica associada a um foco infeccioso. Quando não tratada corretamente, pode evoluir para choque séptico, resultando em falência de órgãos e consequentemente, em óbito (VINCENT, 2013).

Nos EUA, no período entre 1979 e 2000, a incidência de sepse aumentou de 82,7 para 240,4 casos a cada 100.000 indivíduos. De acordo com este estudo, nesse período ocorreram 10.319.418 casos de sepse, sendo mais comum entre homens do que em mulheres (MARTIN, 2003). Apesar de a mortalidade por sepse ter diminuído de 27,8% para 17,9% em 22 anos nos EUA, cerca de 250.000 casos de sepse ainda levam a mortes nos EUA anualmente (GAIESKI, 2013).

O primeiro estudo brasileiro de grande porte abordando este tema foi o *Brazilian Sepsis Epidemiological Study* (BASES), em 2004, que traçou o perfil de pacientes admitidos nas UTI das regiões Sul e Sudeste com a finalidade de determinar a incidência de sepse nesses pacientes. Nesse estudo, foi observada uma incidência de 30,5% de pacientes internados com sepse nas UTIs, e foi estabelecido que a diferença da taxa de sobrevivência entre os pacientes sépticos e não sépticos após 28 dias de internação foi de 66% e 88%, respectivamente (SILVA *et al*, 2004).

Koury *et al*, 2006 estudando 199 pacientes da cidade do Recife admitidos à UTI, observaram que a incidência de sepse foi de 61,9%. A mortalidade foi de 36,3% na sepse grave e de 63,8% no choque séptico; sendo constatada uma associação entre a gravidade da sepse e o risco de morte.

No Brasil, os dados sobre sepse ainda são pouco documentados, devido à consolidação reduzida das informações por diversos hospitais, dificultando o conhecimento da extensão do problema no país, o que colabora para que os pacientes com sepse apresentem piores desfechos clínicos, tais como aumento da mortalidade e do tempo de internação hospitalar, além de piores parâmetros vitais e laboratoriais (HISSA; HISSA; ARAUJO, 2013).

2.1.3 Patogênese

A sepse é resultado de um desbalanceamento hemodinâmico frente a agentes infecciosos e mediadores inflamatórios na circulação sanguínea, gerando alterações no fluxo sanguíneo e na microcirculação (JEAN-BAPTISTE, 2007).

A sintomatologia da reposta séptica é decorrente da resposta imune. Porém, há uma complexa interação entre os processos inflamatório, coagulante e fibrinolítico, que ocorre em resposta a infecção bacteriana. O início desses três processos simultaneamente desempenha papel fundamental na fisiopatologia da sepse e a continuidade destes pode desencadear disfunção endotelial e falência múltipla dos órgãos culminando, se não houver tratamento, com óbito (KOURILSKY; TRUFFA-BACHI, 2001).

Os fatores responsáveis pelo desencadeamento da reposta inflamatória através da ativação celular são, principalmente, os componentes presentes na parede celular dos microrganismos, como o lipopolissacarídeo (LPS), presente em bactérias gram-negativas (endotoxinas). O LPS e as outras toxinas são liberados geralmente durante o processo de replicação bacteriana e/ou decorrente da sua morte, devido à lise da parede celular (STEARNS-KUROSAWA, 2011).

Durante a interação com os patógenos, os componentes inato e adquirido da resposta imune são ativados. A resposta imune inata é a linha de defesa inicial contra a infecção. Há o reconhecimento dos patógenos de maneira inespecífica e a sua resposta é decorrente da liberação de substâncias humoral e celular. Diferentemente da resposta inata, a resposta imune adquirida apresenta um padrão de reconhecimento altamente específico contra antígenos pela capacidade de memória imunológica. A imunidade adquirida, mediada por linfócitos T e B, é fundamentada na interação específica entre a parede celular dos microrganismos e receptores presentes nas células imunológicas (BOZZA, 2010; LE TULZO *et al.*, 2002).

Na resposta imune adquirida ocorre liberação de citocinas pró-inflamatórias na circulação sanguínea levando à ativação de células do sistema imunológico (neutrófilos, monócitos, macrófagos), além de plaquetas e células endoteliais. Junto a isso, há ativação de proteínas plasmáticas, de proteínas do sistema complemento, da coagulação, do sistema fibrinolítico e de contato. Mediadores de lipídios, como os eicosanoides, fator de ativação

plaquetária, bem como espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidos e liberados (VENET *et al.*, 2005) (Figura 1).

Atualmente, a função de alguns mediadores na patogênese da sepse já está bem esclarecida. Estes mediadores podem induzir alterações profundas na fisiologia normal da vasculatura e dos órgãos, e são responsáveis pela patogênese da sepse (OSUCHOWSKI *et al.*, 2006). A interação entre os vários mediadores produzidos leva à depressão do miocárdio, distúrbios vasculares e alterações em órgãos-alvo, como fígado, rins, pulmões e sistema nervoso central. O resultado da resposta inflamatória descompensada é o comprometimento hemodinâmico, levando a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (MODS), que é caracterizada por uma alta mortalidade (VENET *et al.*, 2005).

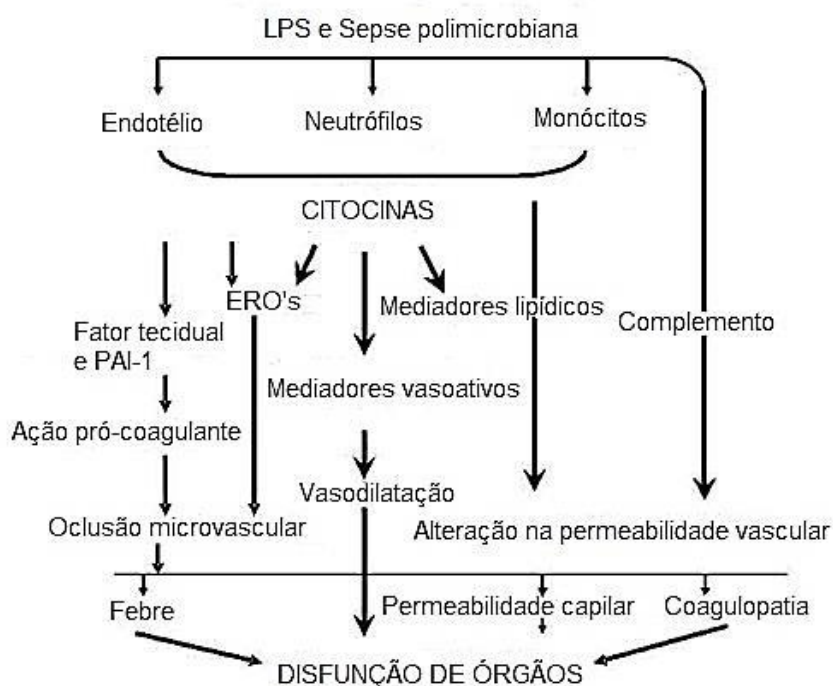


Figura 1. Fisiopatologia da sepse (Adaptada de COHEN, 2002).

2.2 MARCADORES DE PROGNÓSTICO

A avaliação da qualidade e da intensidade da resposta inflamatória pode levar a identificação de pacientes em risco de disfunção de órgãos (TAKALA *et al.*, 2002). Um bom

indicador para sepse deve fazer mais do que prever sobrevida dos pacientes, deve guiar o tratamento e revelar a sua resposta (MARSHALL *et al.*, 2003). Não existe um indicador isolado capaz de promover esta informação, o mais provável é que seja necessário um conjunto de indicadores de inflamação e imunossupressão (TAKALA *et al.*, 2002).

Na prática, existem várias ferramentas para avaliar a gravidade do processo patológico e a ocorrência de disfunção orgânica. Esses instrumentos utilizam marcadores fisiológicos e laboratoriais, e, de maneira decisiva são utilizados para tomada de decisões clínicas, estratificando melhor os pacientes sob risco de evolução ruim, e uniformizando-os para comparações entre estudos clínicos (MARSHALL, 1999).

Durante as últimas duas décadas, outros instrumentos foram desenvolvidos, como o SAPS (*Simplified Acquired Physiological Score*) (LE GALL *et al.*, 1993), o MODS (*Multiple Organ Dysfunction Score*) (MARSHALL *et al.*, 1995), SOFA (*Sepsis-related Organ Failure Assessment*) (VINCENT *et al.*, 1998) e LODS (*Logistic Organ Dysfunction System*) (LE GALL *et al.*, 1996), que podem ser utilizados para quantificar a disfunção em um ou mais órgãos isoladamente ou em conjunto, embora não possam indicar se a disfunção é reversível ou não. Um exemplo de marcador de disfunção orgânica específica é a razão da PaO_2 (pressão parcial de oxigênio no sangue arterial) pela FiO_2 (fração inspirada de oxigênio), que possibilita avaliar a presença de disfunção do sistema respiratório, além de quantificá-la (MARTIN, 2000; MANCEBO, 2001). Esses preditores, em conjunto, podem auxiliar no seguimento ou mesmo sugerir mudanças no tipo de tratamento a ser adotado e são utilizados como modelos de risco de gravidade da doença em pacientes de UTI (MARSHALL, 1999).

A escala de APACHE II (*Acute And Chronic Health Evaluation*) (ANEXO 1) determina a gravidade da doença através da pior medida de 12 variáveis fisiológicas durante as primeiras 24 horas após a admissão na UTI, levando-se em conta as comorbidades prévias e idade. Este score inclui os seguintes fatores de risco: temperatura corporal, pressão arterial média, frequência cardíaca, frequência respiratória, oxigenação sanguínea, pH arterial, sódio, potássio, creatinina, hematócrito, contagem de células brancas sanguíneas, escala de coma de Glasgow, idade e dados relativos a anamnese de insuficiência orgânica severa ou estado imunocomprometido de saúde. Esta é, sem dúvida, a escala prognóstica mais utilizada no contexto clínico, e está validada como preditor de mortalidade em várias situações clínicas. Quanto maior sua pontuação, maior a probabilidade de morte hospitalar do paciente (KNAUS *et al.*, 1985; ARRAES *et al.*, 2006; BOZZA *et al.*, 2010).

O SOFA é um sistema de pontuação para determinar a extensão da disfunção de órgãos ou sua taxa de falha de forma individual em pacientes com Sepsis. Ele é baseado em uma escala de pontuação ou escores na qual a pontuação é baseada em seis pontos diferentes, cada um avaliando as disfunções dos diferentes sistemas como o respiratório, cardiovascular, hepático, a coagulação, os sistemas renal e neurológico (ANEXO 2) (DIAS *et al.*, 2006; BUENO *et al.*, 2005).

2.3 IMUNOSSUPRESSÃO

Mesmo após a descoberta de inúmeros mediadores envolvidos no processo patológico da sepsis, ainda não é possível explicar o porquê da enorme variabilidade clínica dos pacientes portadores da mesma patologia, nem o motivo pelo qual simples lesões podem desencadear graves complicações sistêmicas que conduzem o paciente ao óbito. Portanto é preciso compreender como os sistemas de defesa desorganizam-se a ponto de determinar uma deterioração clínica frente às intervenções terapêuticas (RIVERS *et al.*, 2013).

O estado de disfunção imune resultante da sepsis grave pode levar à morte rápida ou evoluir para um quadro de imunossupressão. Neste sentido, vários estudos clínicos têm demonstrado que pacientes sépticos apresentam aumento da susceptibilidade a infecções secundárias, tais como pneumonia (DELLINGER *et al.*, 2008). Alguns pesquisadores demonstraram que os pacientes, ainda no ambiente hospitalar em recuperação da sepsis grave, apresentam características consistentes com imunossupressão, incluindo inabilidade para combater infecções e uma predisposição a infecções secundárias (LANGENBERG *et al.*, 2008). Em tais pacientes, caso a agressão inicial seja combatida, mecanismos anti-inflamatórios entram em ação para controlar a inflamação. Em alguns pacientes, entretanto, essa reação compensatória pode ser tão exacerbada quanto à resposta pró-inflamatória e determinar imunossupressão excessiva, um estado de imunodeficiência adquirida (KIERS *et al.*, 2010).

Nessa situação, forças pró- e anti-inflamatórias reforçam-se umas as outras, criando uma situação inadequada, deletéria e progressiva, que foge ao controle homeostático e conduz ao acúmulo de falências orgânicas. O grande desarranjo da resposta imunológica resultaria em

aumentos simultâneos de mediadores promotores e inibidores da inflamação (ANGUS; VAN DER POLL, 2013).

2.4 CITOCINAS ENVOLVIDAS NA SEPSE

Um motivo para a falha das respostas anti-inflamatórias, em pacientes com sepse, pode ser as alterações que ocorrem no processo infeccioso durante todo o tempo. Tem sido rotulado que durante a sepse, a resposta imunológica ocorre devido a uma interação entre dois fenômenos inflamatórios opostos. Inicialmente, a sepse é caracterizada por produção em excesso de mediadores inflamatórios (*status* hiperinflamatório) que é, então, gradativamente suprimida pelo surgimento de uma resposta anti-inflamatória (*status* hipoinflamatório), a qual representa uma resposta inflamatória compensatória (KUMAR *et al.*, 2011)

Estudos mostraram que a resposta inflamatória é dinâmica e que as citocinas não apresentam um comportamento linear e constante, estando presentes tanto citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6), como de citocinas anti-inflamatórias, por exemplo, a IL-10, na fase inicial da sepse (OSUCHOWSKI *et al.*, 2006). O estímulo anti-inflamatório fisiológico é o responsável pela sobrevivência do paciente já que irá propiciar um equilíbrio destes mediadores. Porém, caso haja um desequilíbrio destes mediadores, a sepse inicial pode evoluir para choque, falência múltipla dos órgãos e óbito (SCHULTE; BERNHAGEN; BUCALA, 2013).

Fazem parte das citocinas pró-inflamatórias TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 e o interferon-gama (IFN γ), que agem como mediadores do sistema imune (PENG; YUAN; LI, 2005). Eles dão início efetivamente ao processo inflamatório contra os agentes infecciosos. TNF α , IL-1, IL-6 são os responsáveis por elevar os níveis de proteínas na fase aguda inflamatória, que inclui a proteína C reativa (PCR) durante a infecção. O aumento sérico destas citocinas, principalmente a IL-6 e IFN γ tem sido correlacionado com a gravidade e mortalidade no curso da sepse (SCHULTE; BERNHAGEN; BUCALA, 2013).

O estado hiperinflamatório pode conduzir o paciente à vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, hipotensão, choque, falência múltipla de órgãos e morte. No entanto, a resposta anti-inflamatória excessiva resulta na supressão da resposta imune. (SCHOUTEN, 2008). A sepse induz também a produção e elevação dos níveis de citocinas anti-inflamatórias

específicas. A IL-10 é produzida por macrófagos e células dendríticas e está relacionada com o controle imune inato. Ela tem a função de inibir a ativação dos macrófagos, caracterizando-se como exemplo clássico de *feedback* negativo, pois inibe a própria célula que a sintetiza. Atua ainda inibindo outras citocinas, como a IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IL-12, IFN γ e TNF α (VAN DER POLL; OPAL, 2008).

Assim como as citocinas pró-inflamatórias, elevação do nível sérico de IL-10 tem sido relacionada com um pior prognóstico na sepse, sugerindo que a superprodução pode ser um indicador de óbito (GOGOS *et al.*, 2000). Desta maneira, o equilíbrio entre o efeito pró e anti-inflamatório determina a manutenção da homeostase, preservando a função vital do organismo (WARD, 2011).

2.5 POLIMORFISMOS DE CITOCINAS E SEPSE

Variações no material genético de indivíduos podem afetar a probabilidade desses em desenvolver sepse ou subsequentemente pior prognóstico (TEUFFEL *et al.*, 2010). Como consequência, alterações genéticas ou mutações que comprometem o correto funcionamento do sistema imune em identificar e combater microrganismos podem explicar a incapacidade do mesmo na resposta a uma infecção, na diversidade do quadro clínico na sepse, nas respostas aos tratamentos médicos e na predisposição genética de cada indivíduo (SONG *et al.*, 2012). O estudo de simples alterações genéticas dos genes envolvidos na fisiopatologia e na patogenia de doenças é muito importante, pois a variação nesses genes pode predispor a susceptibilidade ou proteção de complicações futuras (AGGARWAL *et al.*, 2011).

A IL6 é conhecida por ser importante em muitos processos celulares. Sua função inclui atividade pro-inflamatória, regulação da ativação de células T, indução da produção de anticorpos, ativação da coagulação e estimulação da hematopoese (AZIZ *et al.*, 2013). O seu gene está localizado no cromossomo 7p21 (Figura 2) e possui cinco polimorfismos descritos na literatura, o polimorfismo na região promotora -634 C>G tem sido descrito e relacionado com diversos processos patológicos, dentre eles doenças cardiovasculares, câncer, doença de Alzheimer, infecções pulmonares, doenças renais, porém nenhum estudo correlacionando-o com a sepse foi ainda realizado (KITAMURA *et al.*, 2002; SHIBATA *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2008; RYU; KIM, 2012).

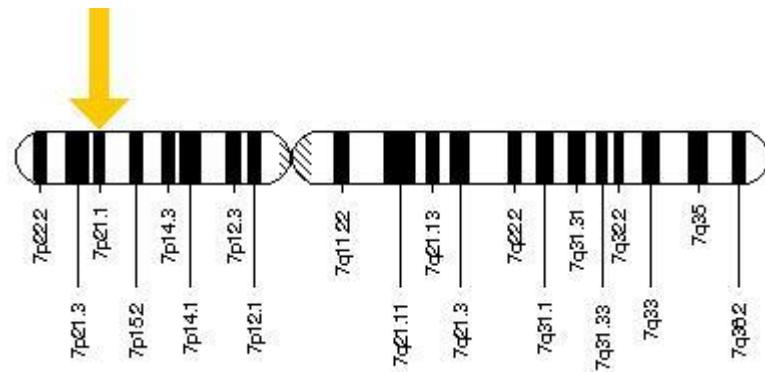


Figura 2. Localização do gene IL6.

A IL10 é um potente agente anti-inflamatório endógeno importante na regulação da homeostase do sistema imunológico. Esta citocina é predominantemente produzida pelas células T auxiliares. Sua produção é desencadeada pelo TNF e endotoxinas, causando uma redução na regulação de citocinas pró-inflamatórias e prevenindo a apoptose celular (ANDALUZ-OJEDA *et al.*, 2012).

O gene da IL10 está localizado no cromossomo 1q31-q32 (Figura 3) e o SNP -1082 G>A na região promotora do gene é bastante descrito na literatura (TURNER *et al.*, 1997). Esse polimorfismo foi estudado em doenças como melanoma, câncer de próstata, câncer cervical, mieloma múltiplo, doenças parasitárias, hepatite C, pneumonia e também em pacientes diagnosticados com sepse (TURNER *et al.*, 1997; HOWELL *et al.*, 2001; MCCARRON *et al.*, 2002; ROH *et al.*, 2002; TEMPLE *et al.*, 2003; MAZUR *et al.*, 2005; CHUANG *et al.*, 2009; CARREGARO *et al.*, 2010; MEDINA *et al.*, 2011).

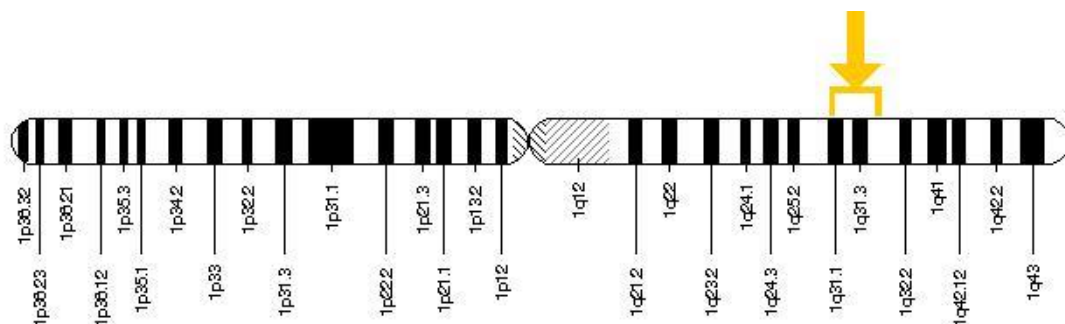


Figura 3. Localização do gene IL10

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3 REFERÊNCIAS

1. AGGARWAL, S.; ALI, S.; CHOPRA, R. et al. Genetic variations and interactions in anti-inflammatory cytokine pathway genes in the outcome of leprosy: a study conducted on a MassARRAY platform. **J Infect Dis** 204:1264–1273, 2011.
2. ALBERTI, C. et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. **Intensive care medicine**, 28(2): 108-121, 2002.
3. ANDALUZ-OJEDA, D. A combined score of pro- and anti-inflammatory interleukins improves mortality prediction in severe sepsis. **Cytokine** 57: 332–336, 2012.
4. ANGUS, D. C.; VAN DER POLL, T. Severe sepsis and septic shock. **New England Journal of Medicine**, 369(9): 840-851, 2013.
5. ARRAES, S. M.; FREITAS, M. S. et al. Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. **Blood**, 108(9): 2906-13, 2006.
6. AZIZ, M. et al. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. **Journal of Leukocyte Biology** 93: 329-341, 2013.
7. BAUER, P.R.; KASHYAP, R.; LEAGUE, S. C. et al. Diagnostic accuracy and clinical relevance of an inflammatory biomarker panel for sepsis in adult critically ill patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 84: 175-180, 2016.
8. BOOMER, J.S. et al. "Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure." **Jama** 306(23): 2594-2605, 2011.
9. BOZZA, F. A.; CARNEVALE, R.; JAPIASSU, A.M. et al.. Early fluid resuscitation in sepsis: evidence and perspectives. **Shock**, 34: 40-43, 2010.
10. BUENO, L.O.; GUIMARÃES, H.P.; LOPES, R.D. et al. Avaliação dos índices prognósticos SOFA e MODS em pacientes pós-parada cardiorrespiratória em Unidade Intensiva Geral. **Rev Bras Ter Intensiva**. 3:162–164, 2005.
11. CARREGARO, F. et al. Polymorphisms IL10-819 and TLR-2 are potentially associated with sepsis in Brazilian patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 105(5): 649-656, 2010.
12. CHAWLA, L. S. et al. Elevated plasma concentrations of IL-6 and elevated APACHE II score predict acute kidney injury in patients with severe sepsis. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, 2(1): 22-30, 2007.

13. CHUANG, J. Y. et al. IL-10 promoter gene polymorphisms and sustained response to combination therapy in Taiwanese chronic hepatitis C patients. **Digestive and Liver Disease**, 41(6): 424-430, 2009.
14. CLARK, E.; KUMAR, A.; LANGOTE, A. et al. Septic shock in chronic dialysis patients: clinical characteristics, antimicrobial therapy and mortality. **Intensive Care Medicine** 42: 222-232, 2016.
15. COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature** 420: 885-891, 2002.
16. COLLINS, F.C.; GREEN, E.D.; GUTTMACHER, A. et al. A vision for the future genomics research. **Nature**, 422: 835-841, 2003.
17. DELLINGER, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. **Intensive care medicine**, 34(1): 17-60, 2008.
18. DIAS, A.T.; MATTOS, P. O.; NUNES, W.A. Índices de Gravidade em Unidade de Terapia Intensiva Adulto. Avaliação Clínica e Trabalho de Enfermagem. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva** 18, 2006.
19. FISHMAN D, FAULDS G, JEFFERY R, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **J Clin Invest**, 102: 1369–76, 1998.
20. FLEISCHMANN, C; SCHERAG, A; ADHIKARI, N.K.J. et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** 193: 259-272, 2016.
21. GAIESKI, D.F. et al. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. **Crit Care Med**. 41: 1167–1174, 2013.
22. GOGOS, C. A. et al. Pro-versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. **Journal of Infectious Diseases**, 181(1): 176-180, 2000.
23. HAN-OH, C.; ROCHWERG, B.; ALISON, E. The Treatment of Sepsis: From Failed Therapies to New Possibilities. **Vascular Responses to Pathogens** 10: 221-231, 2016.
24. HISSA, P. N. G.; HISSA, M. N. R, ARAÚJO, P. S. R. Comparative analysis between two scores in predicting mortality in intensive care unit. **Rev Bras Clin Med**. São Paulo, 11(1): 21-6, 2013.

25. HO, K. M. Combining sequential organ failure assessment (SOFA) score with acute physiology and chronic health evaluation (APACHE) II score to predict hospital mortality of critically ill patients. **Anaesthesia and intensive care**, 35(4): 515, 2007.
26. HOLMES, C.L.; RUSSEL, J.A.; WALLEY, K.R. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: Role in prognosis and potential for therapy. **Chest**, 124: 1103, 2003.
27. HOTCHKISS, R.S.; GUILLAUME, M.; DIDIER, P. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. **The Lancet infectious diseases** 13(3): 260-268, 2013.
28. HOWELL, W.M.; TURNER, S.J.; BATEMAN, A.C. et al. IL-10 promoter polymorphisms influence tumour development in cutaneous malignant melanoma. **Genes Immun** 2: 25-31, 2001.
29. JEAN-BAPTISTE, E. Cellular mechanisms in sepsis. **J Intensive Care Med**. 22(2): 63-72, 2007.
30. KIERS, H.D.; GRIESDALE, L .A. et al. Effect of early achievement of physiologic resuscitation goals in septic patients admitted from the ward on the kidneys. **J Crit Care** 25: 563-569, 2010.
31. KITAMURA, A.; HASEGAWA, G.; OBAYASHI, H. et al. Interleukin-6 polymorphism (-634 C/G) in the promotor region and the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. **Diabet Med**, 19:1000-1005, 2002.
32. KNAUS, W. A.; DRAPER, E. A. et al. APACHE II: a severity of disease classification system. **Crit Care Med**, 13(10): 818-29, 1985.
33. KOURILSKY, P.; TRUFFA-BACHI, P. Cytokine fields and the polarization of the immune response. **Trends in Immunology**, 22: 502-509, 2001.
34. KOURY, J.C.A.; LACERDA, H.R.; BARROS NETO, A.J. Características da população com sepse em unidade de terapia intensiva de hospital terciário e privado da cidade do Recife. **Rev. bras. ter. intensiva**, 18(1); 52-58, 2006.
35. KUMAR, G.; KUMAR, N.; TANEJA, A. et al.: Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). **Chest** 140: 1223-31, 2011.
36. LANGENBERG, C. et al. The histopathology of septic acute kidney injury: a systematic. **Critical care**, 12: 8, 2008.
37. LE GALL, J. R.; KLAR, J. et al. The Logistic Organ Dysfunction system. A new way to assess organ dysfunction in the intensive care unit. ICU Scoring Group. **Jama**, 276(10): 802-10, 1996.

38. LE GALL, J. R.; LEMESHOW, S. et al. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. **Jama**, 270(24): 2957-63, 1993.
39. LE TULZO, Y.; PANGAULT, C.; GACOUIN, A. et al. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. **Shock**, 18: 487-94, 2002.
40. LEVER, A.; MACKENZIE, I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. **Bmj**, 335(7625): 879-883, 2007.
41. LEVY, M.M.; FINK, M. P.; MARSHALL, J. C. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Intensive Care Med** 29:530–538, 2003.
42. LUNDBERG, J.S.; PERL, T. M.; WIBLIN, T. et al. Septic shock: an analysis of outcome for patients with onset on hospital wards versus intensive care units. **Crit Care Med**, 26:1020-1024, 1998.
43. MANCEBO, J. Acute respiratory distress syndrome. **Rev Esp Anesthesiol Reanim**, 48(10):465-70, 2001.
44. MARSHALL, J. C. Organ dysfunction as an outcome measure in clinical trials. **Eur J Surg Suppl**, 584:62-7, 1999.
45. MARSHALL, J. C., D. J. COOK, et al. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. **Crit Care Med**, 23(10): 1638-52, 1995.
46. MARSHALL, J.C.; VINCENT, J.L.; FINK, M.P. Measures markers, and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis. **Crit Care Med** 31:1560-1567, 2003.
47. MARTIN, G. S. Fluid balance and colloid osmotic pressure in acute respiratory failure: emerging clinical evidence. **Crit Care**, 4(2): 21-5, 2000.
48. MARTIN, G. S.; MANNINO, D. M.; EATON, S.; MOSS, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N Engl J Med**. 348(16): 1546-54, 2003.
49. MAZUR, G et al. IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms do not associate with the susceptibility for multiple myeloma. **Immunology letters**, 96(2): 241-246, 2005.
50. MCCARRON, S.L.; EDWARDS, S.; EVANS, P.R. et al. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. **Cancer Res** 62:336-272, 2002.

51. MEDINA, T. S. et al. Increased interleukin-10 and interferon- γ levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. **Malaria journal**, 10(1), 2011.
52. OSUCHOWSKI, M. F.; WELCH, K.; SIDDIQUI, J. et al. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. **J. Immunol.**, 177: 1967-1974, 2006.
53. PENG, Y.; YUAN, Z.; LI, H. Removal of inflammatory cytokines and endotoxin by veno-venous continuous renal replacement therapy for burned patients with sepsis. **Burns**, 31(5): 623-628, 2005.
54. RIVERS, E.P.; JAEHNE, A.K.; NGUYEN, H.B. et al. Early biomarker activity in severe sepsis and septic shock and a contemporary review of immunotherapy trials: not a time to give up, but to give it earlier. **Shock**, 39(2): 127-137, 2013.
55. ROH, J.W.; KIM, M. H.; SEO, S.S. et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms and cervical cancer risk in Korean women. **Cancer Lett** 184: 57-63, 2002.
56. RYU, J.H; KIM, S.J. Interleukin-6-634 C/G and-174 G/C polymorphisms in Korean patients undergoing hemodialysis. *The Korean journal of internal medicine*, 27(3): 327-337, 2012.
57. SCHOUTEN, M. et al. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. **Journal of leukocyte biology**, 83(3): 536-545, 2008.
58. SCHULTE, W.; BERNHAGEN, J.; BUCALA, R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets—an updated view. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.
59. SHIBATA, N.; OHNUMA, T.; TAKAHASHI, T. et al. Effect of IL-6 polymorphism on risk of Alzheimer disease: genotype phenotype association study in Japanese cases. **Am J Med Genet**, 114:436-439, 2002.
60. SILVA, E.; SOGAYAR, A. C.; MOHOVIC, T. et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit Care** 8(4): 251-60, 2004.
61. SONG, Z.; SONG, Y.; YIN, J. et al. (2012) Genetic variation in the TNF gene is associated with susceptibility to severe sepsis, but not with mortality. **Plos one**. 7(9): 1-10, 2012.
62. STEARNS-KUROSAWA, D.J.; OSUCHOWSKI, M.F.; VALENTINE, C.; et al. The Pathogenesis of Sepsis. **Annu Rev Pathol**. 6: 19–48, 2011.

63. TAKALA, A.; NUPPONEN, I.; KYLANPAA-BACK, M.L. et al. Markers of inflammation in sepsis. **Ann Med** 34: 614-623, 2002.
64. TEMPLE, S. et al. Alleles carried at positions– 819 and– 592 of the IL10 promoter affect transcription following stimulation of peripheral blood cells with *Streptococcus pneumoniae*. **Immunogenetics**, 55(9): 629-632, 2003.
65. TEUFFEL, O.; ETHIERMC, B.J.; SUNG, L. Association between tumor necrosis factor-alpha promoter –308 A/G polymorphism and susceptibility to sepsis and sepsis mortality: a systematic review and meta-analysis. **Crit Care Med** 38: 276–282, 2010.
66. TURNER, D. M.; WILLIAMS, D. M.; SANKARAN, D. et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **Eur J Immunogenet** 24:1-8, 1997.
67. VAN DER POLL, T.; OPAL, S. M. Host–pathogen interactions in sepsis. **The Lancet infectious diseases**, 8(1): 32-43, 2008.
68. VENET, F.; BOHE, J.; DEBARD, A. L. et al. Both percentage of gammadelta T lymphocytes and CD3 expression are reduced during septic shock. **Crit Care Med.**, 33: 2836-2840, 2005.
69. VINCENT, J. L., MENDONCA, A et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. **Crit Care Med**, 26(11): 1793-800, 1998.
70. VINCENT, J.L. et al. Sepsis definitions: time for change. **Lancet** 381, 774–775, 2013.
71. WARD, P. A. Immunosuppression in sepsis. **JAMA** 306, 2618–2619, 2011.
72. YIN, Y.W.; SUN, Q.Q.; FENG, J.Q. et al. Influence of interleukin gene polymorphisms on development of acute pancreatitis: a systematic review and meta-analysis. **Mol Biol Rep.** 40(10): 5931-41, 2013.
73. ZHANG, D. et al. Association of IL-6 Gene Polymorphisms with Cachexia Susceptibility and Survival Time of Patients with Pancreatic Cancer. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 38(2), 2008.

4 OBJETIVOS

4.1 *Objetivo geral*

Avaliar a associação entre polimorfismos das IL6 e IL10 ao agravamento em pacientes admitidos na Unidade de Terapia Intensiva de um Hospital Cardiológico e estabelecer comparações com diferentes escores clínicos de prognóstico e biomarcadores inflamatórios.

4.2 *Objetivos específicos*

- Realizar as dosagens das citocinas IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, INF e TNF e correlacionar com o APACHE II e o SOFA em amostras de pacientes admitidos em UTI cardiológica;
- Avaliar os polimorfismos no promotor das IL6 (-634 C>G) e IL10 (-1082 G>A) em pacientes admitidos na UTI, correlacionando com os escores SOFA e APACHE II e com os marcadores inflamatórios.

5 ARTIGO

ASSOCIATION BETWEEN GENETIC POLYMORPHISMS OF INTERLEUKINS AND PROGNOSIS MARKERS IN PATIENTS WITH SEPSIS

Romério Alencar de Oliveira Filho¹

Fabício Oliveira Souto²

Monique Ferraz de Sá Beltrão²

Dilênia de Oliveira Cipriano torres³

Danyelly Bruneska Gondim Martins^{2,4}

Rosângela Ferreira Frade de Araújo^{2,4*}

José Luiz de Lima Filho^{2,4}

¹Post Graduate Program in Biology Applied to Health, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife – PE, Brazil.

²Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife – PE, Brazil.

³Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco-PROCAPE/UPE, Recife-PE, Brazil

⁴Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife – PE, Brazil.

Keywords: Sepsis; Promoter polymorphisms; Interleukins; IL6; IL10.

***Corresponding author:** Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, CEP: 50670-901, Brazil. Fax: +55 81 21268485. E-mail address: rfrade@prospecmol.org.

Artigo a ser submetido

5.1 ABSTRACT

Objective: The objective of this study was to evaluate genetic polymorphisms in the promoter region of ILs 6 and 10, associating the mortality in patients admitted to the ICU of the Cardiologic Hospital of Pernambuco – PROCAPE, Recife - Brazil and correlating the results with the APACHE II and SOFA predictor scores and levels of biomarkers of inflammation.

Patients and methods: A total of 120 patients (including 70 sepsis patients and 50 controls) were enrolled. Plasma cytokines levels were determined by Cytometric Bead Array Th1/Th2 kit. Polymorphisms in the IL6(-634C>G) and IL10(-1082G>A) gene promoter were studied using restriction length polymorphism polymerase chain reaction analysis. Prognosis scores and interleukins levels were compared between the patient groups with different IL6 e IL10 genotypes.

Results: Among the patients included in the study, the group of those with sepsis (87% with lung infection) showed higher points in APACHE II and SOFA scores and higher serum levels of IL-6 and IL-10. The polymorphisms evaluated in the IL6 and IL10 promoter regions had no effect on serum levels of these cytokines and was not associated with sepsis or with the scores, except the G allele of IL10 (-1082) that was associated with points higher than 7 in SOFA.

Conclusion: The APACHE II and SOFA scores were good indicators of mortality. In this study, although the IL6 polymorphism (-634C>G) demonstrated not be involved in the process of worsening sepsis, the G allele of IL10 gene (-1082G> A) acted as a risk factor when related to the SOFA score. However, as these genes are very polymorphic, it is necessary a wider association studies of prognostic scores including other polymorphisms.

5.2 INTRODUCTION

Sepsis is a clinical syndrome of systemic inflammatory response secondary to an infectious process in focus presumed or known (LINEBERRY & STEIN, 2014). Early diagnosis of sepsis plays an integral role in the morbidity and mortality of patients admitted in the intensive care unit (ICU), because it ensures the early and correct administration of antibiotics (GAIESKI *et al.*, 2013). Sepsis can be self-limiting or progress to severe sepsis

and septic shock, where the circulatory abnormalities (intravascular volume depletion, peripheral vasodilation, increased metabolism and myocardial depression) lead to imbalance between the need and the demand of oxygen, resulting in global hypoxia or shock. The tissue hypoxia reflects the severity of the disease and is predictive of the development of multiple organ failure (VINCENT *et al.*, 2013).

The evaluation of the quality and the intensity of the inflammatory response may lead to identification of patients at risk of organ dysfunction. A good indicator for sepsis should do more than provide for the survival of patients, must guide the treatment and reveal his answer (HUTCHINS *et al.*, 2014). There is no isolated indicator able to promote this information, most likely requiring a set of indicators of inflammation and immunosuppression. Several prognostic scores that match different clinical and laboratory parameters such as the Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II (APACHE II) and Sepsis Related Organ Failure Assessment (SOFA) are used as models of risk of disease severity in patients admitted to the ICU with the purpose of predicting mortality (RODRIGUEZ-GASPAR *et al.*, 2001).

An example of molecules that play a key role in host defense against infectious and inflammatory processes are the cytokines released in response to activation of specific receptors. The interleukins (ILs), e.g., produced by macrophages and epithelial cells, promoting the recruitment of macrophages and other leukocytes to the site of infection (BOZZA *et al.*, 2010). To achieve a better understanding of these mechanisms of immune activation, several studies have demonstrated the association of Single Base Polymorphisms (SNP) of ILs front to infections and inflammatory processes. A good example of this association occurs for the IL-6 where, in this promoter polymorphisms have been observed in healthy and diseased populations, however some studies have demonstrated the association of SNP -634 C>G with increased levels of IL-6, relating this polymorphism to a higher risk of Alzheimer disease, Diabetes mellitus, arthritis, sepsis, among others (FISHMAN *et al.*, 1998; SHIBATA *et al.*, 2002; KITAMURA *et al.*, 2002; CARREGARO *et al.*, 2010; RYU; KIM *et al.*, 2012; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015).

The expression of IL-10, identified primarily the polymorphism in the promoter region -1082 G>A strongly associated with the expression of large amounts of IL-10 involved in pneumoniae, hepatitis C, melanoma, lung cancer, multiple myeloma, and individuals with

septic shock (HOWELL *et al.*, 2001; TEMPLE *et al.* 2003; CHUENG-MING *et al.*, 2005; MAZUR *et al.*, 2005; BOIARDI *et al.*, 2006; CHUANGA *et al.*, 2009).

Thus, the objective of this research was to study the genetic polymorphisms in the promoter of the IL-6 (-634 C>G) and IL-10 (-1082 G>A) associated with the deterioration of patients admitted to the ICU of Cardiology Hospital of Pernambuco – PROCAPE and draw comparisons with prognosis scores (APACHE II and SOFA) and biomarkers of inflammation.

5.3 MATERIAL & METHODS

Casuietry

Were analyzed samples of 70 patients with clinical condition indicative of sepsis admitted to the ICU of the Cardiology Hospital of Pernambuco (PROCAPE) and 50 controls patients.

Study design

Analytical study of case-control from January / 2014 to February / 2016 with samples of adult patients with sepsis.

Inclusion and exclusion criteria

The inclusion criteria were considered: adult patients with and without sepsis admitted to the ICU with clinical and / or surgical diseases, consecutively and randomly. Exclusion criteria: patients younger than 18, pregnant patients, patients who have had previous use of steroids or chemotherapy and patients who died or were discharged within 24 hours after ICU admission.

Clinical and biochemical data

The patients' clinical data were obtained from medical records and from a database PROCAPE, which were updated every visit by the medical team.

Measurement of prognostic scores

In the first 24 hours of ICU admission all patients had APACHE II score calculated. The SOFA score was calculated using the worst parameter values observed in the 1st, 2nd, 3rd, 5th, 7th, 14th and 28th days of hospitalization. Each category was scored zero (no or minimal impairment) at four points (maximum disorder), based on a predefined cutoff.

Quantification of cytokines

The cytokines Kit Th1 / Th2 Cytometric Bead Array (CBA) (BD TM Biosciences) was used for quantification of interleukin IL2, IL4, IL6, IL10, tumor necrosis factor (TNF) and protein levels of interferon- γ (IFN- γ) based on the capture and detection of analytes in size and fluorescence using flow cytometry. The analysis of the CBA data was performed using the FCAP Array software (BD BiosciencesTM).

Molecular analysis

Genomic DNA was extracted from blood cells by Wizard® SV Genomic DNA Purification System. The genotypes of patients with respect to SNPs in the gene of IL6 and IL10 were determined by PCR - RFLP (polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism) of the promoter regions using primers and specific restriction enzymes to identify the IL6 polymorphisms (-634C>G) and IL10 (-1082G>A).

The IL6-634 C/G polymorphism was amplified using primers for PCR amplification: 5'-GAG ACG CCT TGA AGT AAC TG-3', 5'- AAC CAA AGA TGT TCT GAA CTG A-3'. The following PCR protocol was used: 95°C for 3 min, 35 cycles of 95°C for 1 min, 59°C for 1 min, 74°C for 2 min, 72°C for 5 min. The reaction final volume presented 12.5 μ L. The PCR products were digested with 2U of BsrBI (New England Biolabs) at 37°C for 30 minutes. The digested products were separated by 2% agarose gel electrophoresis and identified by ethidium bromide staining. The resulting products of 180 bp, 120+60 bp, and 180+120+60 bp demonstrated the CC, GG, and CG genotypes, respectively.

The IL10 single nucleotide polymorphisms (SNP) at promoter -1082 site were detected by PCR using primers forward 5'CTC GTC GCA ACC CAA CTG G 3', reverse 5' TCT TAC CTA TCC CTA CTT CC 3'. The PCR mixtures contained a 12.5 μ L final volume. Amplification of the specific DNA fragments were performed using a Applied Thermal

Cycler (Biosystems) according to the following thermocycler conditions: denaturation at 94 °C for 10 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 45 s, and extension at 72 °C for 1 min. This was followed by final extension at 72 °C for 10 min. RFLP assays were performed with specific restriction enzyme MnlI (New England Biolabs). In the presence of the IL-10 –1082G allele, MnlI cut the 139 bp PCR product into two bands of 106 and 33 bp. The digestion products were stained with ethidium bromide and visualized on a 2% agarose gel.

Ethical aspects of the research

The experimental design of this study was approved by ethics committee on research under the number: 08412412.2.0000.5192. All patients who agreed to participate signed the free and informed consent form.

Statistical analysis

The risk genotypes for the different clinical and prognostics characteristics of patients with sepsis were analyzed by chi-square test, calculating the odds ratio (confidence interval of 95%) by software GraphPad Prism 6.

5.4 RESULTS AND DISCUSSION

Characteristics of the study population

A total of 120 individuals, including 70 patients with sepsis diagnosis (35 males and 35 females with a mean age of 61.6 ± 17.0), together with 50 patients controls without sepsis (30 males and 20 females with a mean age of 60.7 ± 15.7), were included in this research. The advanced age of the patients, regardless of diagnosis of sepsis is also a constant in several studies, since life expectancy is increasing, and the elderly are at greater risk for serious diseases that result in ICU (MARTIN *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2004; PADKIN *et al.*, 2003; ANNANE *et al.*, 2003; SALES JR *et al.*, 2006; BLANCO *et al.*, 2008).

The main sites of infection pulmonary (87%) were followed by the urinary tract, cutaneous infection and endocarditis, each representing 3% of our study population. In previous studies, respiratory tract also was the main focus of infection, accounting for over 50% of cases (SILVA *et al.*, 2004; SALES JR *et al.*, 2006).

The main comorbidities were reported to the cardiovascular system and the respiratory system. The heart disease (62 patients – 32.8%) were represented mainly by congestive heart failure, acute myocardial infarction and cardiomyopathy. There were 43 cases (22.8%) of high blood pressure (pressure > 140/90 mmHg). 41 patients (21.7%) had respiratory tract involvement, exemplified especially by chronic obstructive pulmonary disease. Chronic kidney disease was present in 20 individuals (10.6%), followed by Diabetes mellitus (19 patients – 10.0%). And finally, 4 patients (2.1%) had neurologic disorders. The presence of comorbidities in this population, especially those related to cardiovascular and respiratory systems, is the reflection of study with patients in the ICU and with a population of age increasingly advanced. Similar results were found in other studies with the Brazilian population (SILVA *et al.*, 2004; SALES *et al.*, 2006).

Cytokines analysis

IL6 is a pro-inflammatory cytokine produced by a variety of cells, especially macrophages, dendritic cells, lymphocytes, endothelial cells, fibroblasts and smooth muscle cells in response to stimulation of LPS present in gram-negative bacteria (PAPANICOLAOU *et al.*, 1998). High concentrations of IL-6 are found in many pathological conditions such as burns, major surgery and sepsis. The plasma levels of IL-6 are elevated in these conditions and correlated with the severity of many diseases, and also with the occurrence of multiple organ failure and septic shock (SCHULTE; BERNHAGEN; BUCALA, 2013).

IL10 is a cytokine produced by many types of immune system cells, such as monocytes, macrophages, B and T lymphocytes and NK cells and have anti-inflammatory function, acting as "feedback" negative, that is, inhibiting synthesis of pro-inflammatory cytokines (ABBAS; LICHTMAN, 2005). High concentrations of IL-10 reduce the production of TNF- α ; IL-1; IL-6 and IL-8 by monocytes, while trigger (for "feedback" positive) the production of IL-1Ra (GONZALEZ *et al.*, 2003). The suppression of IL-10 results in

increased serum levels of circulating IL-6, suggesting that this cytokine has anti-inflammatory great power (LOISE *et al.*, 2003).

The determination of the levels of cytokines in plasma revealed that the interleukins IL6 and IL10 (normal reference values are considered below 5,9pg/mL and 9.1pg/mL, respectively) showed increased relevant, reinforcing the data from previous studies that cytokines are related to infectious processes. The other evaluated cytokines (IL2, IL4, INF γ , TNF) are shown below detection levels, showing no relevant clinical significance for the study. Higher serum levels of IL-6 and IL-10 were found in patients with sepsis as compared to the control group (Figure 1).

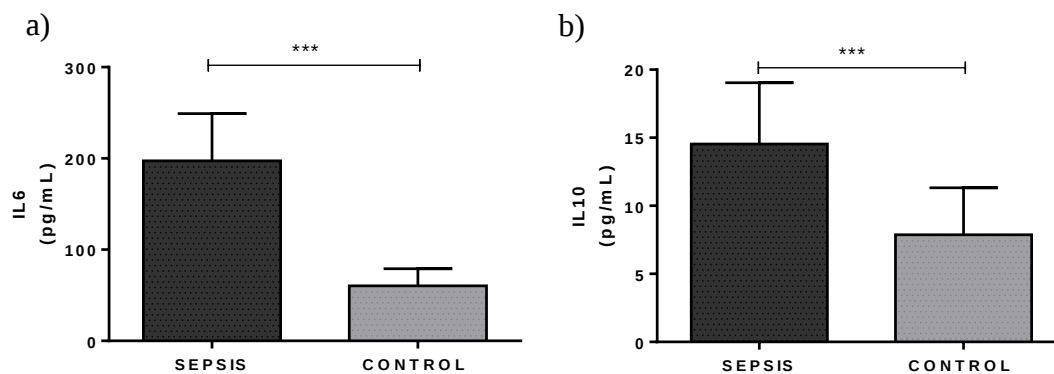


Figure 1. Interleukins levels in patients with sepsis and controls.

Determination of prognosis scores

APACHE II and SOFA are based on the assumption that the severity of illness can be measured by quantify the degree of abnormality of a number of physiological varieties. These prognostic indices have been extensively validated worldwide, is the most widely used methods for predicting mortality (SILVA *et al.*, 2004).

The APACHE II score mean was 24.8 in individuals with sepsis and 18.1 in controls. The average SOFA score on the first day of admission was 7.6 in patients with sepsis and 4.3

in controls. Comparing the median APACHE II scores between the groups of patients who died and were discharged from the ICU admission, it is observed that on the death group the severity score had a mean of 26 points, while that in the group of patients who were discharged the APACHE average was 19 points. In the comparison of medians between groups was statistically significant ($p = 0.0005$) (Figure 2a).

In SOFA analysis the results were similar: in the group of patients who died average score was 8.2 points. In the group that the patients were discharged, the SOFA score average was 4.4 (Figure 2b). The difference between the median was statistically significant ($p < 0.0001$) when comparing the groups.

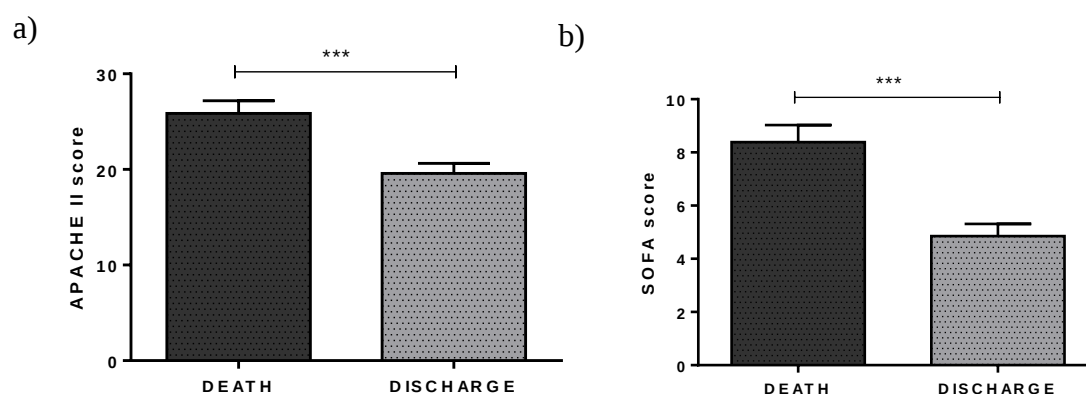


Figure 2. Correlation between APACHE II (a) and SOFA (a) scores and mortality.

Several studies have found that the mortality rate significantly increases when the APACHE II score exceeds the value 20 and the SOFA when greater than 7 is also a predictor of mortality. Then we made the correlation between the genotypes and values of the scores ($\text{APACHE II} \geq 20$ and < 20 ; $\text{SOFA} \geq 7$ and < 7) (SILVA *et al.*, 2004; SALES JR *et al.*, 2006; KOURY *et al.*, 2006).

Among the 70 patients with sepsis, 55 (78.6%) had APACHE II score above 20 and 15 (21.4%) below 20. Of the 55 patients with APACHE II score above 20, 30 (54.5%) had a fatal outcome. Regarding the SOFA, 41 (58.6%) had a score above 7 and 29 (41.4%) were below 7. Among 41 individuals with SOFA greater than 7, 24 (58.5%) evolved to death.

Although the increase of the interleukins IL6 and IL10 are associated with a poor clinical condition of the patient, they were not found significant results when compared to scores of poor prognosis (APACHE II $\geq$ 20 and SOFA $\geq$ 7) ($P > 0.05$) (Figure 3).

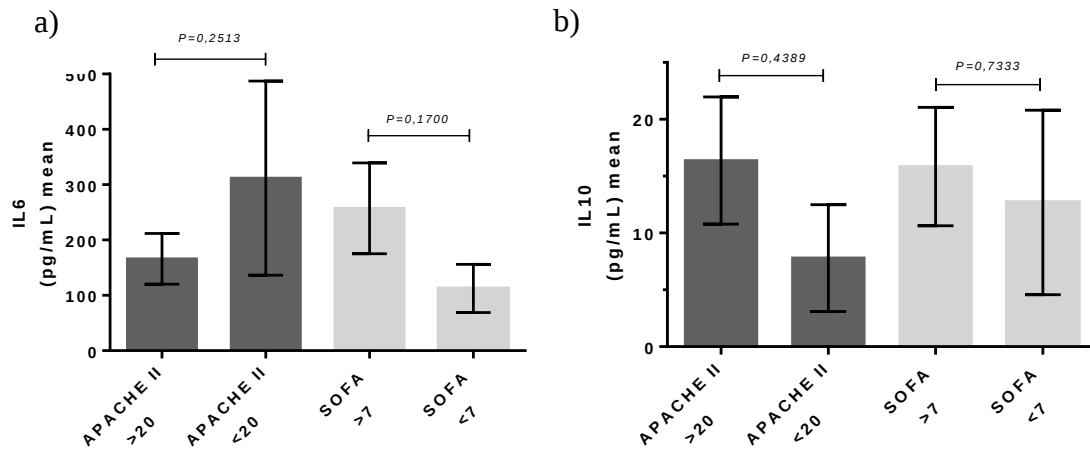


Figure 3. Association between IL6 (a) and IL10 (b) levels and risk scores.

Distribution of genotypes

Polymorphisms on position IL6-634 and IL10-1082 have been investigated in several diseases (FISHMAN *et al.*, 1998; NISHIMURA *et al.*, 2002; CARREGARO *et al.*, 2010; HELMINEN *et al.*, 2001). In addition, researches demonstrated that IL6 promoter polymorphism regulates downstream IL6 levels (MOORE *et al.*, 2001). While the IL 10-1082 polymorphisms associated with higher IL10 production (MANGIA *et al.*, 2004). The frequencies of distribution of IL6 -634C>G genotypes showed that the genotype CG heterozygous was the most prevalence in the both groups (with sepsis and control). Extreme similarity between frequencies of the groups was observed, which revealed no statistical significance (Table 1). The results of genotype frequencies of IL-10 promoters, as summarized in Table, indicated that genotype distributions GG, GA, and AA were no significantly different between the sepsis and the control groups. The most frequent genotype was AA, followed by the GA and GG genotypes.

Although our study did not show significant association between genotypic frequency of polymorphisms IL6-634 and sepsis, other research groups have reported that frequency of allele G IL6-634 was significantly higher in pancreatic cancer patients (ZHANG *et al.*, 2008), and also is a risk factor for renal disease progression (BURACZYNSKA *et al.*, 2007). On the other hand, corroborating our findings, in a study of pulmonary aspergillosis was not found significant association between the severity of the disease and IL6 polymorphism (SAINZ *et al.*, 2008).

Although we have not found an association between IL 10-1082 polymorphism and the risk of developing sepsis, results revealed that genetic polymorphism at IL10-1082 was significantly associated with the susceptibility to lung cancer since individuals with IL-10-1082 G allele (CHUEN-MING *et al.*, 2005), infection by hepatitis C virus (MANGIA *et al.*, 2004), besides being related to the risk of septic shock (GARNACHO-MONTERO *et al.*, 2006). Other studies have confirmed lack of correlations between IL10-1082 SNPs and the susceptibility to multiple myeloma (MAZUR *et al.*, 2005).

Table 1. IL6 and IL10 promoter polymorphisms in patients with sepsis (n = 70) and controls (n = 50).

Genotype		SEPSIS (n=70)	CONTROL (n=50)	χ^2	P value	Odds Ratio	CI 95%
IL6 (-634C>G)	CC	0 (0.00%)	0 (0.00%)	*			
	CG	67 (95.7%)	48 (96.00%)	0,0059	0,9384	0,9306	0,1496 - 5,787
	GG	3 (4.3%)	2 (4.00%)				
IL10 (-1082G>A)	GG	1 (1.42%)	2 (4.00%)	0,957	0,3279	0,3137	0,0273 - 3,604
	GA	18 (25.72%)	16 (32.00%)	0,721	0,3958	0,7059	0,3154 - 1,580
	GG+GA	19 (27.14%)	18 (36.00%)	1,073	0,3003	0,6623	0,3030 - 1,447
	AA	51 (72.86%)	32 (64.00%)				

* incalculable; OR: odds ratio; CI confidence interval

Relation between the IL6 and IL10 polymorphism and plasma cytokines levels

In addition, no differences in plasma IL6 and IL10 levels were found as a function of the IL6-634 and IL10-1082 genotypes, respectively. IL6 values were higher in patients with

IL6-634 genotype CG heterozygous individuals than in those with genotype GG, but without statistical significance ($p>0.05$) (Figure 4a). Likewise, a higher 10 level was observed in patients with IL6-634 genotype GA heterozygous individuals than in those with IL-634 genotype GG or AA, however showed no significance ($p>0.05$) (Figure 4b). Taken together, these results suggest that both heterozygous mutant genotypes have elevated levels of interleukin, but possibly they are not involved in the modulation of IL6 e IL10 levels. The very low number of patients with CC (IL-6) and GG (IL-10) genotypes can have contributed to these findings.

Conversely, -634G carrier patients with Alzheimer's disease tend to have higher plasma IL- 6 level (SHIBATA *et al.*, 2002). IL10-1082G variant has been shown to correlate with high IL10 production in patients with hepatitis C (CHUANG *et al.*, 2009). Since the A allele of the -1082 region is associated with a decrease in IL10 production (WATTANATHUM *et al.*, 2005).

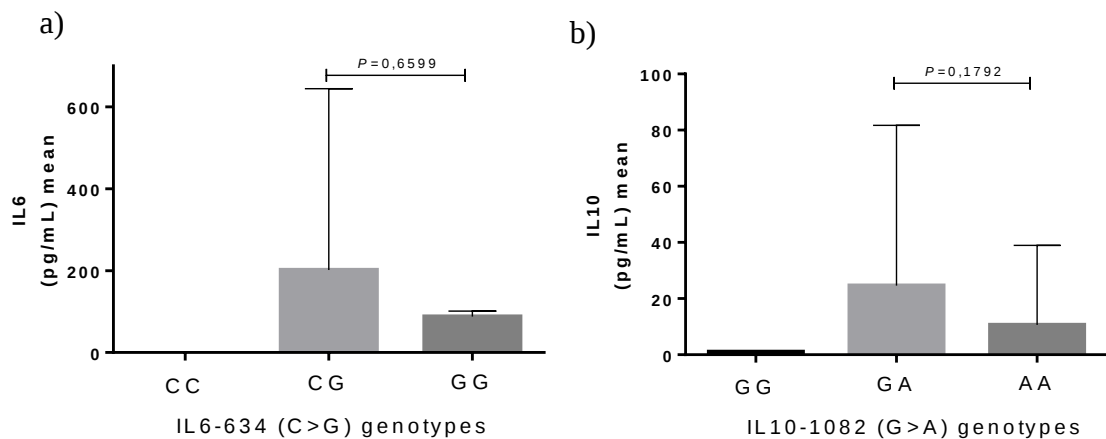


Figure 4. Distribution of IL6 (a) e IL10 (b) level by genotypes.

Relation between polymorphisms and prognosis scores

The correlation was made between individual genotypes and the prognostic scores APACHEII and SOFA. The association between IL 6-634 and IL 10-1082 genotypes were not statistically significant for the APACHE II score (Table 2). These data demonstrate that

genotype has little influence on the severity of the patient, whereas when higher the score, the worse the prognosis.

Regarding the SOFA score, only the genotypes IL10-1082 GA were statistically significant ($p = 0.0477$ and $p = 0.0347$, respectively). This shows that the G allele of IL10-1082 polymorphism may influence the severity of the patient when considering the SOFA score (Table 3). We found only one patient with GG genotype, this fact may be unable to find the association between this genotype and SOFA higher than 7.

Table 2. IL6 and IL10 promoter polymorphisms considering the prognosis score APACHE II.

Genotype		APACHE II ≥ 20 (n=55)	APACHE II < 20 (n=15)	X^2	<i>P</i> value	Odds Ratio	CI 95%
IL6 (-634C>G)	CC	0 (0.00%)	0 (0.00%)	*			
	CG	52 (94.54%)	15 (100.0%)	0,042	0,837	0,4839	0,0236 - 9,892
	GG	3 (5.46%)	0 (0.00%)				
IL10 (-1082G>A)	GG	1 (1.82%)	0 (0.00%)	0,621	0,430	0,7590	0,0288 - 20,02
	GA	13 (23.63%)	5 (33.33%)	0,522	0,470	0,6341	0,1832 - 2,196
	GG+GA	14 (25.45%)	5 (33.33%)	0,370	0,543	0,6829	0,1989 - 2,344
	AA	41 (74.55%)	10 (66.67%)				

* incalculable; OR: odds ratio; CI confidence interval

Table 3. IL6 and IL10 promoter polymorphisms considering the prognosis score SOFA.

Genotype		SOFA ≥ 7 (n=41)	SOFA < 7 (n=29)	X^2	<i>P</i> value	Odds Ratio	CI 95%
IL6 (-634C>G)	CC	0 (0.00%)	0 (0.00%)	*			
	CG	38 (92.69%)	29 (100.0%)	0,792	0,3735	0,1864	0,00926 - 3,754
	GG	3 (7.31%)	0 (0.00%)				
IL10 (-1082G>A)	GG	1 (2.44%)	0 (0.00%)	0,0015	0,9690	2,887	0,1122 - 74,25
	GA	14 (34.14%)	4 (13.8%)	3,9210	0,0477	3,365	0,9742 - 11,63
	GG+GA	15 (36.58%)	4 (13.8%)	4,4620	0,0347	3,606	1,0510 - 12,36
	AA	26 (63.42%)	25 (86.2%)				

* incalculable; OR: odds ratio; CI confidence interval

5.5 CONCLUSION

Sepsis remains a major challenge for both clinicians and for researchers despite its pathophysiology is relatively understood, the clinical variability reveals a difficulty for a correct treatment, mainly due to the fact that sepsis is characterized as a complex disease and dynamics surrounding both inflammatory and immune responses increased as decreased.

How expected, the APACHE II and SOFA scores were good indicators of mortality. Higher levels of IL-6 and IL-10 were observed in patients with sepsis. Although the IL6 polymorphism (-634C> G) demonstrate not be involved in the process of worsening sepsis, the G allele of IL10 polymorphisms (-1082G> A) acted as a risk factor when related to the SOFA score.

Several causes can explain the variation in results between the polymorphisms: different ethnic groups, environmental factors, epigenetic, beyond the advanced age, comorbidities, and decreased immune response and protection mechanisms. Furthermore, gene regulation can be a complex process associated with the haplotype, thus the effect of polymorphisms of a single SNP may be hard to interpret since there are other SNPs in these genes.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no conflict of interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco/FACEPE.

REFERENCES

- ABBAS AK, LICHTMAN AH. Cytokines. In: Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 5th ed. Philadelphia: **Elsevier**. p.243-74, 2005.
- ANNANE, D.; AEGERTER, P.; JARS-GUINCESTRE, M. C. et al. Network. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Réa Network. **Am J Respir Crit Care Med** 168(2): 165-72, 2003.
- BLANCO, J.; MURIEL-BOMBÍN, A.; SAGREDO, V. et al. Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicenter study. **Crit Care** 12(6): 158-163, 2008.
- BOIARDI, L.; CASALI, B.; FARNETTI, E. et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms in giant cell arteritis. **Arthritis & Rheumatism**, 54: 4011–4017, 2006.
- BOZZA, F. A.; CARNEVALE, R.; JAPIASSU, A.M. et al.. Early fluid resuscitation in sepsis: evidence and perspectives. **Shock**, 34: 40-43, 2010.
- BURACZYNSKA M, JOZWIAK L, KSIAZEK et al. Interleukin-6 gene polymorphism and faster progression to end-stage renal failure in chronic glomerulonephritis. **Transl Res**, 150: 101-105, 2007.
- CARREGARO, F. et al. Polymorphisms IL10-819 and TLR-2 are potentially associated with sepsis in Brazilian patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 105(5): 649-656, 2010.
- CHUANG, J. Y. et al. IL-10 promoter gene polymorphisms and sustained response to combination therapy in Taiwanese chronic hepatitis C patients. **Digestive and Liver Disease**, 41(6): 424-430, 2009.
- CHUEN-MING, S. et al. The involvement of genetic polymorphism of IL-10 promoter in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer** 50: 291-297, 2005.
- DE OLIVEIRA, R. et al. ADIPOQ and IL6 variants are associated with a pro-inflammatory status in obesities with cardiometabolic dysfunction. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, 7:34-45, 2015.

FISHMAN D, FAULDS G, JEFFERY R, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **J Clin Invest**, 102: 1369–76, 1998.

GAIESKI, D.F. et al. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. **Crit Care Med**. 41: 1167–1174, 2013.

GARNACHO-MONTERO, J. et al. Timing of adequate antibiotic therapy is a greater determinant of outcome than are TNF and IL-10 polymorphisms in patients with sepsis. **Critical Care**, 10 (4): 111-117, 2006.

GONZALEZ, B E.; MERCADO, C.K.; JOHNSON, L. et al. Early markers of late onset sepsis in premature neonates: clinical, hematological and cytokine profile. **J Perinat Med**. 31:60–8, 2003.

HELMINEN, M.E.; KILPINEN, S.; VIRTÄ, M. et al. Susceptibility to primary Epstein-Barr virus infection is associated with interleukin-10 gene promoter polymorphism. **J Infect Dis** 184: 777-780, 2001.

HOWELL, W.M.; TURNER, S.J.; BATEMAN, A.C. et al. IL-10 promoter polymorphisms influence tumour development in cutaneous malignant melanoma. **Genes Immun** 2: 25-31, 2001.

HUTCHINS, N.A.; UNSINGER, J.; HOTCHKISS, R.S. et al. The new normal: immunomodulatory agents against sepsis immune suppression. **Trends in Molecular Medicine**, 20(4), 2014.

KITAMURA, A.; HASEGAWA, G.; OBAYASHI, H. et al. Interleukin-6 polymorphism (-634 C/G) in the promoter region and the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. **Diabet Med**, 19:1000-1005, 2002.

KOURY, J.C.A.; LACERDA, H.R.; BARROS NETO, A.J. Características da população com sepse em unidade de terapia intensiva de hospital terciário e privado da cidade do Recife. **Rev. bras. ter. intensiva**, 18(1); 52-58, 2006.

LINEBERRY, C.; STEIN, D. E. Infection, Sepsis, and Immune Function in the Older Adult Receiving Critical Care. **Crit Care Nurs Clin N Am** 26: 47–60, 2014.

LOISE P, RINNE T, LAINE S, et al. Anti-inflammatory cytokine response and the development of multiple organ failure in severe sepsis. **Acta Anaesthesiol Scand**. 47: 319–25, 2003.

MANGIA A, SANTORO R, PIATTELLI M, et al. IL-10 haplotypes as possible predictors of spontaneous clearance of HCV infection. **Cytokine** 25: 103–9, 2004.

MARTIN, G. S.; MANNINO, D. M.; EATON, S.; MOSS, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N Engl J Med**. 348(16): 1546-54, 2003.

MAZUR, G et al. IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms do not associate with the susceptibility for multiple myeloma. **Immunology letters**, 96(2): 241-246, 2005.

MOORE KW, DE WAAL MALEFYT R, COFFMAN RL, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Ann Rev Immunol** 19: 683–765, 2001.

NISHIMURA M, MATSUOKA M, MAEDA M, et al. Association between interleukin-6 gene polymorphism and human T-cell leukaemia virus type I associated myelopathy. **Hum Immunol** 63:696–700, 2002.

PADKIN, A.; GOLDFRAD, C.; BRADY, A. R. et al. Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland. **Crit Care Med** 31(9): 2332-8, 2003.

PAPANICOLAOU, D. A.; WILDER, R. L.; MANOLAGAS S. C. et al. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. **Annals of Internal Medicine**, 128(2): 127–137, 1998.

RODRIGUEZ-GASPAR, M. et al. Prognostic value of cytokines in sepsis General medical patients. **Cytokine**, 15(4): 232–236, 2001.

RYU, J.H; KIM, S.J. Interleukin-6-634 C/G and-174 G/C polymorphisms in Korean patients undergoing hemodialysis. **The Korean journal of internal medicine**, 27(3): 327-337, 2012.

SAINZ J., PÉREZ E., GÓMEZ-LOPERA S., et al. Genetic variants of IL6 gene promoter influence on C-reactive protein levels but are not associated with susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis in haematological patients. **Cytokine**. 41(3): 268–278, 2008.

SALES JR, J. A.; DAVID, C. M.; HATUM, R. et al. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. **Rev Bras Ter Intensiva** 18(1): 9-17, 2006.

SCHULTE, W.; BERNHAGEN, J.; BUCALA, R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets—an updated view. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.

SHIBATA, N.; OHNUMA, T.; TAKAHASHI, T. et al. Effect of IL-6 polymorphism on risk of Alzheimer disease: genotype phenotype association study in Japanese cases. **Am J Med Genet**, 114:436-439, 2002.

SILVA, E.; SOGAYAR, A. C.; MOHOVIC, T. et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit Care** 8(4): 251-60, 2004.

TEMPLE, S. et al. Alleles carried at positions— 819 and— 592 of the IL10 promoter affect transcription following stimulation of peripheral blood cells with *Streptococcus pneumoniae*. **Immunogenetics**, 55(9): 629-632, 2003.

VINCENT, J.L. et al. Sepsis definitions: time for change. **Lancet** 381, 774–775, 2013.

WATTANATHUM, A. et al. Interleukin-10 haplotype associated with increased mortality in critically ill patients with sepsis from pneumonia but not in patients with extrapulmonary sepsis. **CHEST Journal**, 128(3): 1690-1698, 2005.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como esperado, os escores APACHE II e SOFA foram bons indicadores de mortalidade. Níveis mais elevados de IL-6 e IL-10 foram observados nos pacientes com sépsis. Embora o polimorfismo IL6 (-634C> G) não tenha demonstrado estar envolvido no processo de agravamento da sepse, o alelo G do polimorfismo IL10 (-1082G> A) agiu como um fator de risco quando relacionado com o escore SOFA.

Várias causas podem explicar a variação nos resultados entre os polimorfismos: grupos étnicos diferentes, fatores ambientais, fatores epigenéticos, além da idade avançada, comorbidades presentes e a diminuição dos mecanismos imunológicos. Além disso, a regulação do gene representa um processo complexo relacionado com o haplótipo, assim, o efeito de polimorfismos de um único SNP pode ser difícil de interpretar, uma vez que existem outros polimorfismos presentes nestes genes.

7 PERSPECTIVAS

Considerando-se a grande quantidade de polimorfismos candidatos a marcadores de prognóstico e risco no desenvolvimento da sepse, a genotipagem de outros polimorfismos das ILs, como os SNPs IL6-174(G>C) e IL10-819(T>C), trará um estudo mais completo do papel de variações genéticas na susceptibilidade ao agravamento da sepse, visto que permitirá a avaliação do efeito acumulativo de múltiplos polimorfismos. Podendo também ser necessária a avaliação de outras moléculas e/ou receptores ligados à via metabólica das ILs, bem como a investigação de mecanismos epigenéticos.

ANEXOS

ANEXO1



Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II
(APACHE II)

Nome: _____ Idade: _____ anos Leito: _____
Prontuário: _____ Data de admissão: _____

1 - Variáveis fisiológicas e laboratoriais coletadas nas primeiras 24 h

	+4	+3	+2	+1	0	+1	+2	+3	+4
Temperatura (°C)	≥41	39-40,9		38,5-38,9	36-38,4	34-35,9	32-33,9	30-31,9	≤29,9
Pressão arterial média (mmHg)	≥160	130-159	110-129		70-109		50-69		≤49
Frequência cardíaca (bpm)	≥180	140-179	110-139		70-109		55-69	40-54	≤39
Frequência respiratória (rpm)	≥50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		≤5
(A-a) com FiO ₂ ≥ 0,5	>500	350-499	200-349		≤200				
PO ₂ com FiO ₂ < 0,5					>70	61-70		55-60	≤55
pH arterial	≥7,7	7,6-7,69		7,5-7,59	7,3-7,49		7,25-7,3	7,15-7,2	<7,15
Sódio sérico (mEq/L)	≥180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	≤110
Potássio sérico (mEq/L)	≥7	6-6,9		5,5-5,9	3,5-5,4	3-3,4	2,5-2,9		≤2,5
Creatinina sérica (mg%)	≥3,5	2-3,4	1,5-1,9		0,6-1,4		<0,6		
Hematócrito (%)	≥60		50-59,9	46-49,9	30-45,9		20-29,9		≤20
Leucócitos (x1000mm ³)	≥40		20-39,9	15-19,9	3-14,9		1-2,9		≤1

2 - Escala de Glasgow

3 - Idade (anos): ≤44:0 ; 45-54:2 ; 55-64:3 ; 65-74:5 ; ≥75:6

4 - Doenças crônicas: clínico: 5; cirúrgico de urgência: 5 ; cirúrgico eletivo:2

TOTAL DE PONTOS: _____ 0-4: 4% NÃO-OP., 1% PÓS-OP / 5-9:8%, 3% / 10-14: 15%, 7% / 15-19: 24%,12% 20-24: 40%, 30% / 25-29: 55%, 35% / 30-34: 73%, 73%/ 35-100: 85%, 88%.

ANEXO II



PROCAPE

Sepsis Related Organ Failure Assessment (SOFA)

Nome: _____ Idade: _____ anos Leito: _____
 Prontuário: _____ Data de admissão: _____

1 - Variáveis fisiológicas e laboratoriais coletadas no primeiro, segundo, terceiro, quinto, sétimo, 14º e 28º dia de internação.

PONTUAÇÃO VARIÁVEL	0	1	2	3	4
PaO ₂ /FiO ₂	> 400	≤ 400	≤ 300	≤ 200±VM	≤ 100±VM
Plaquetas (x10 ³)	> 150	≤ 150	≤ 100	≤ 50	≤ 20
Bilirrubinas (mg%)	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 5,9	6,0 – 11,9	> 12
Cardiovascular	PAM Normal	PAM < 70	Dopa < 5 e/ou Dobutamina	Dopa > 5 Epi ≤ 0,1 Nor ≤ 0,1	Dopa > 15 Epi > 0,1 Nor > 0,1
Escala de Glasgow	15	13 – 14	10 – 12	6 – 9	< 6
Creatinina (mg%) ou Diurese (mL/dia)	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 3,4	3,5 – 4,9 ou < 500	3,5 – 4,9 ou < 500

Dopa = Dopamina (µg/Kg/min); Epi = Epinefrina (µg/Kg/min); Nor = Noradrenalina (µg/Kg/min)

PAM = Pressão Arterial Média; PaO₂/FiO₂ = Pressão Arterial de Oxigênio/Fração Inspirada de Oxigênio; VM = Ventilação Mecânica.

ANEXO III

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

1. Dados do participante:

Nome: _____

RG: _____ CPF: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Sexo: () Masculino () Feminino

Endereço: _____ n°: _____

Complemento: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

Estado: _____ CEP: _____

Telefone/Operadora: (____) _____ - _____

2. Título do Protocolo de Pesquisa:

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE INTERLEUCINAS À MORTALIDADE EM PACIENTES ADMITIDOS NA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA DE UM HOSPITAL CARDIOLÓGICO CONSIDERANDO DIFERENTES SCORES PROGNÓSTICOS E MARCADORES DE INFLAMAÇÃO

3. Dados do Investigador Principal:

Profa. Dra. Rosângela Ferreira Frade de Araújo

Dados para contato: Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Av. Professor Moraes Rêgo S/N, Cidade Universitária, Recife-PE. CEP 50670-901 - Fone: 87731888/ 21268587

4. Avaliação do Risco da Pesquisa:

() Risco mínimo (X) Risco baixo () Risco médio () Risco maior

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo).

5. Duração da Pesquisa: 3 anos.

Termo de consentimento livre e esclarecido conforme as diretrizes da resolução CNS 196/96 para projeto: **Escore clínico e biomarcadores associados à mortalidade em pacientes admitidos na unidade de terapia intensiva de um hospital cardiológico.**

O estudo intitulado **“ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE INTERLEUCINAS E RECEPTORES TOLL-LIKE À MORTALIDADE EM PACIENTES ADMITIDOS NA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA DE UM HOSPITAL CARDIOLÓGICO CONSIDERANDO DIFERENTES SCORES PROGNÓSTICOS E MARCADORES DE INFLAMAÇÃO”**, sob a responsabilidade de Dra. Rosângela Ferreira Frade de Araújo, a ser realizado no Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) – Unidade Coronária I (UCO I) e no LIKA – UFPE tem como objetivo verificar a associação entre fatores de risco com a mortalidade em pacientes admitidos na UTI.

Você foi convidado a participar desse estudo por ser admitido na UCO I do PROCAPE, caso concorde em participar, sua colaboração no estudo consistirá nas seguintes etapas:

1- Como protocolo da UCO I, exames laboratoriais são solicitados diariamente para a sua monitorização durante o período de internação. Nas primeiras 24 horas de admissão na UCO I amostras de seu sangue venoso, 10 mL, serão coletadas como de rotina para exames laboratoriais, utilizaremos estas amostras para a dosagem de procalcitonina, proteína C reativa ultrasensível. Interleucina (IL)-3, IL-6, IL-8, IL-10 e polimorfismo das interleucinas (IL-6 e IL-10). Os resultados dos seus exames de NRBCs, eosinófilos, plaquetas, leucócitos, creatinina, bilirrubinas, alanina aminotransferase, sódio, potássio, gasometria e tempo de protrombina serão copilados dos exames laboratoriais de rotina para o seu acompanhamento diário.

2- Seu prontuário hospitalar será consultado para avaliar a sua pontuação do escore *Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II* (APACHE II) e escore *Sepsis Related*

Organ Failure Assessment (SOFA), modelos de risco de gravidade da doença utilizados na UCO I.

3- O projeto não fornece benefício ou compensação financeira para a sua participação no estudo.

4- Se você concordar, sua amostra de sangue poderá ser guardada e poderá ser utilizada em estudos futuros desde que aprovados por Comitê de Ética em Pesquisa.

Riscos:

1- Existe um pequeno risco nas coletas de sangue como a formação de um hematoma e dor. As coletas de sangue serão feitas por profissional treinado. O Hospital lhe dará a mesma assistência caso isto ocorra com você.

Técnica de punção venosa e arterial: inicialmente, deve-se explicar todo o procedimento ao paciente, seguindo-se da colocação do torniquete na porção proximal do braço para facilitar a visualização da veia a ser puncionada. Segue-se com a assepsia rigorosa do sítio de punção realizada com soluções degermantes a base de clorexidina, polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I) ou com álcool a 70%. A utilização de luvas e máscara é obrigatória. Então, realiza-se a punção venosa ou arterial com agulha e seringa descartáveis para colheita do sangue para exames laboratoriais e em seguida, nova assepsia e compressa local. Quanto às possíveis complicações podemos ter: formação de hematomas, trombose venosa e tromboflebites. Para cada complicação, deve-se proceder à sua resolução imediata.

Técnica líquido cefalorraquidiano (LCR): A coleta de LCR será feita por meio de uma punção, em ambiente hospitalar, que pode ser suboccipital (logo abaixo do crânio) ou lombar (entre a terceira, a quarta e a quinta vértebra lombares) é imprescindível que o procedimento seja totalmente estéril e realizado por um profissional treinado. Por conseguinte a coleta, o paciente deve permanecer em repouso por, no mínimo, 12 horas e hidratação forçada. Quanto às possíveis complicações podemos ter: sangramento, cefaleia e lombalgia. Para cada complicação, deve-se proceder à sua resolução imediata.

2- Você tem a garantia que suas informações pessoais serão mantidas em sigilo e que manteremos os resultados deste estudo confidencial. Tanto o questionário quanto as amostras serão identificados por número código e não por seu nome.

Benefícios:

Você não é obrigado a participar deste estudo e a qualquer momento você poderá tirar a sua permissão de participação. O projeto não lhe fornecerá nenhum benefício pessoal ou compensação financeira por sua participação. Participando, você contribuirá para o melhor entendimento sobre biomarcadores que indiquem o prognóstico dos pacientes de UTI, como a gravidade da doença, presença de infecção ou resposta inflamatória sistêmica, a fim de se obter alternativas terapêuticas precoces, mais seletivas e menos danosas para os pacientes. Se, a qualquer momento, você retirar sua permissão de participação no estudo, suas amostras de sangue serão descartadas.

Esclarecimentos:

Você tem a garantia de qualquer esclarecimento, pelos pesquisadores responsáveis, antes e durante o curso da pesquisa. Nosso estudo não resultará em despesas para a instituição, para você e nem para seus familiares.

Consentimento para guarda da amostra de sangue e uso em estudo futuro:

Sua amostra de sangue poderá ser guardada e poderá ser utilizada em outros estudos futuros se aprovados por Comitê de Ética em Pesquisa

***Assinale apenas uma das alternativas abaixo:**

() Sim, eu permito que minha amostra seja guardada para possível utilização em outros estudos, se aprovado pela Comissão de Ética e eu não preciso ser contatado na ocasião.

() Sim, eu permito que minha amostra seja guardada para possível utilização em outros estudos, se aprovado pela Comissão de Ética, mas eu quero ser contatado na ocasião para novo consentimento. Número de telefone para contato:_____

() Não, eu não permito que minha amostra seja guardada para possível utilização em outros estudos.

DECLARO QUE LI E ENTENDI TODAS AS INFORMAÇÕES E CONCORDO NA MINHA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA ACIMA. TENHO LIBERDADE DE RETIRAR O MEU CONSENTIMENTO EM QUALQUER FASE DA PESQUISA, CASO NÃO QUEIRA CONTINUAR PARTICIPANDO DA MESMA, SEM PREJUÍZO ALGUM.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

SE VOCÊ NÃO ESTIVER EM CONDIÇÕES FÍSICAS OU MENTAIS DE DECIDIR SOBRE SUA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO, SEU REPRESENTANTE LEGAL PODERÁ ASSINAR ESTE TERMO.

Nome do representante legal: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Assinatura do pesquisador responsável