

ISABELA NASCIMENTO BORGES

AVALIAÇÃO DO NÍVEL SÉRICO DE
INTERLEUCINA-3 COMO MARCADOR
PROGNÓSTICO NA SEPSE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE/MG

2016

ISABELA NASCIMENTO BORGES

AVALIAÇÃO DO NÍVEL SÉRICO DE
INTERLEUCINA-3 COMO MARCADOR
PROGNÓSTICO NA SEPSE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Júnior.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora: Prof^a. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof^a. Denise Maria

Trombert de Oliveira

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof^a. Adelina Martha dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

DEPARTAMENTO DE CLINICA MÉDICA

Chefe do departamento: Prof. Valéria Maria Augusto

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho (Coordenador)

Prof. Antônio Luiz Pinto Ribeiro (Subcoordenador)

Prof^a. Maria do Carmo Pereira Nunes

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.

Prof^a. Denise Utsch Gonçalves

Prof. Unaí Tupinambás

Pollyana Anício Magalhães Gontijo (Representante discente)

I

Para apalpar as intimidades do mundo é preciso saber:

- a) Que o esplendor da manhã não se abre com faca
- b) O modo como as violetas preparam o dia para morrer
- c) Por que é que as borboletas de tarjas vermelhas têm devoção por túmulos
- d) Se o homem que toca de tarde sua existência num fagote, tem salvação
- e) Que um rio que flui entre 2 jacintos carrega mais ternura que um rio que flui entre 2 lagartos
- f) Como pegar na voz de um peixe
- g) Qual o lado da noite que umedece primeiro.

etc.

etc.

etc.

Desaprender 8 horas por dia ensina os princípios.

III

Repetir repetir — até ficar diferente.

Repetir é um dom do estilo.

Manoel de Barros

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Vandack.

Aos pacientes que participaram deste estudo.

Aos colegas do NIIMI, em especial à Carol.

Ao Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, em especial à Érica.

Aos estudantes Andrea, Eurípedes e Lucas.

Ao Hospital das Clínicas da UFMG, ao CTI e sua equipe.

À equipe do Laboratório de Urgência do Hospital das Clínicas da UFMG.

Aos queridos mamãe, papai, Pedro, Rere, toda a nossa família, além dos grandes amigos e amigas que estão sempre ao meu lado.

RESUMO

Estudo recente demonstrou que a interleucina 3 (IL-3) exerce papel relevante na fisiopatologia da sepse e que níveis elevados dessa citocina predizem pior prognóstico. O objetivo do presente estudo foi o de avaliar o papel prognóstico da IL-3 em pacientes com sepse internados em terapia intensiva, considerando a mortalidade hospitalar como desfecho primário. Foi conduzida uma coorte ambispectiva no Centro de Terapia Intensiva do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Pacientes adultos com sepse ou choque séptico iniciados em até 48 horas foram incluídos e acompanhados até alta hospitalar ou óbito. Níveis de IL-3 foram dosados no soro coletado nos dias 1, 3 e 7 a partir da inclusão, sendo em seguida testada a associação desses níveis com variáveis clínicas e laboratoriais. Adicionalmente avaliaram-se os níveis circulantes de citocinas pró e anti-inflamatórias (perfil de resposta Th1, Th2 e Th17) mensurados à inclusão destes pacientes. 120 pacientes foram incluídos de outubro/2012 a janeiro/2016, sendo 20 (17%) com sepse e 100 (83%) com choque séptico. A idade média da população foi de 55 (\pm 18) anos, e 68 (57%) dos pacientes eram do sexo masculino. As medianas dos escores Apache II e SOFA à inclusão foram 17 (Q1-Q3:12-22) e 8 (Q1-Q3:6-11) pontos, respectivamente. A mortalidade observada aos 28 dias, na UTI (unidade de terapia intensiva) e no hospital foi de 24%, 22,5% e 34%, respectivamente. Os níveis séricos de IL-3 mensurados à inclusão mostraram-se significativamente mais elevados entre os pacientes que faleceram quando comparados aos pacientes que sobreviveram à internação hospitalar (91,2 pg/ml vs 36,0 pg/ml, $p=0,024$). Valores iniciais de IL-3 acima de 127,5 pg/ml mostraram-se significativamente associados a mortalidade hospitalar ($p=0,019$; OR= 2,97; IC 95% 1,27 - 6,97). Tal associação se manteve em análise multivariada ($p=0,01$) ajustada para o APACHE II e PCR. Em modelo de sobrevivência de Cox incluindo a idade do paciente e os valores sequenciais de SOFA, os níveis de IL-3 mensurados à inclusão mantiveram-se independentemente associados a mortalidade hospitalar ($p=0,005$). Os níveis das citocinas IL-6 e IL-10 mensurados no dia 1 também se mostraram significativamente mais elevados nos pacientes que faleceram na internação. Em conclusão, níveis séricos de IL-3 obtidos no momento da admissão do paciente séptico em terapia intensiva

mostraram-se independentemente associados à mortalidade hospitalar, mesmo após ajustes para idade, APACHE II e SOFA.

Palavras-chave: Sepsis, biomarcadores, interleucina-3, prognóstico, terapia intensiva

ABSTRACT

A recent study has shown that interleukin 3 (IL-3) plays a key role in the pathophysiology of sepsis and septic shock, and that high levels of this cytokine predict poor prognosis. The aim of this study was to evaluate the IL-3 prognostic role in patients with sepsis in an intensive care unit, considering hospital mortality as the primary outcome. An ambispective cohort was conducted in the Intensive Care Unit of the Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Adult patients with sepsis or septic shock initiated within 48 hours were included and followed until hospital discharge or death. IL-3 levels on days 1, 3 and 7 from inclusion were measured in serum and associated with clinical and laboratory variables. Additionally we assessed the levels of pro and anti-inflammatory cytokines (profiles Th1, Th2 and Th17) at inclusion. One hundred and twenty patients were included from October / 2012 to January / 2016, twenty (17%) with sepsis and one hundred (83%) with septic shock. The average age of the population was 55 (\pm 18) years and 68 (57%) patients were male. The median APACHE II and SOFA scores at inclusion were 17 (Q1-Q3: 12-22) and 8 (Q1-Q3: 6-11) points, respectively. The mortality observed after 28 days, in the ICU, and in the hospital was 24%, 22.5% and 34%, respectively. Serum levels of IL-3 measured at inclusion were significantly higher among patients who died compared with patients who survived at hospital discharge (91.2 pg / ml vs 36.0 pg / ml, $p = 0.024$). Initial values of IL-3 above 127.5 pg / ml were significantly associated with hospital mortality ($p = 0.019$; OR = 2.97, 95% CI 1.27 to 6.97). This association remained present in a multivariate analysis ($p = 0.01$) adjusted for APACHE II and PCR. In Cox survival model considering IL-3 levels measured at inclusion, patient's age and sequential values of SOFA, IL-3 values remained independent associated with mortality ($p = 0.005$). The levels of IL-6 and IL-10 measured on day 1 were also significantly higher in those who died in hospital. In conclusion, serum IL-3 levels of septic patients measured from the time of admission in intensive care correlates with prognosis. Higher levels of this cytokine were shown to be independently associated with hospital mortality in this population, even after adjusting for age, APACHE II and SOFA.

Key words: Sepsis, biomarker, interleukin-3, prognosis, intensive care

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- APACHE II – *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*
- AUC – Área sob curva
- BPM – Batimentos por minuto
- CARS – *Compensatory anti-inflammatory response syndrome*
- CLP – *Cecal ligation and puncture*
- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- FMO – Falência de Múltiplos órgãos
- GM-CSF - *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
- HC-UFMG – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
- HLA - *Human leukocyte antigen*
- HR – *Hazard Ratio*
- IFN γ – Interferon gama
- IL-1 – Interleucina-1
- IL-1 β – Interleucina-1 beta
- IL-2 – Interleucina-2
- IL-3 – Interleucina-3
- IL-4 – Interleucina 4
- IL-6 – Interleucina-6
- IL-10 – Interleucina-10
- IL-17A - Interleucina-17A
- ILAS – Instituto Latino Americano de Sepsis
- IRA-B – Células B Ativadoras da Resposta Inata
- IRPM – Incursões Respiratórias por Minuto
- LPS – Lipopolissacarídeos
- mg/dL - Miligramas por decilitro
- mm³ – Milímetros cúbicos
- mmHg – Milímetros de mercúrio
- MODS – Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos
- NET – *Neutrophil Extracellular Traps*

- NIIMI – Núcleo Interdisciplinar de Investigação em Medicina Intensiva
- OR – Odds Ratio
- PAC – Pneumonia Adquirida na Comunidade
- PAMP – *Pathogen-associated Molecular Pattern*
- PAR – Receptores Ativados por Proteases
- PAVM – Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica
- Pco2 – Pressão arterial de gás carbônico
- PCT - Procalcitonina
- PCR – Proteína C Reativa
- pg/ml – picograma por mililitro
- RR – risco relativo
- SAPS 3 – *Simplified Acute Physiology Score 3*
- SIRS – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
- SNP - Single nucleotide polymorphism
- SOFA – *Sequential Organ Failure Assessment Score*
- SSCG – *Surviving Sepsis Campaign Guidelines*
- TGF β - *Transforming growth factor beta*
- Th1 – Linfócitos T helper tipo 1
- Th2 – Linfócitos T helper tipo 2
- Th17 - Linfócitos T helper tipo 17
- TLR – *Toll Like Receptor*
- TNF α – Fator de Necrose Tumoral
- UCIA – Unidade de Cuidados Intensivos do Adulto
- UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
- UTI – Unidade de Terapia Intensiva
- WT – *Wild Type*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

Figura 1 – Mortalidade anual por sepse grave e choque séptico – comparação entre dados de hospitais públicos e hospitais privados presentes no Banco de dados do ILAS de 2005 a 2015. Extraído do Relatório Nacional dos Protocolos Gerenciados de Sepse do Instituto Latino Americano de Sepse, ano 2016.	24
Figura 2 – Comparação entre camundongos selvagens (WT) e Il3- após sepse experimental induzida por CLP no estudo de Weber et al. Curva de sobrevida de Kaplan-Meier em camundongos sem antibioticoterapia (n = 10 por grupo) e sob antibioticoterapia (n = 12 e 13 por grupo). Extraído de WEBER et al.....	32
Figura 3 – Comparação entre camundongos selvagens (WT) e Il3- após sepse experimental induzida por CLP no estudo de Weber et al. A - Dosagem de neutrófilos e monócitos Ly-6c em 1 mililitro de sangue em 0, 6, 12 e 24 horas após CLP (n = 3 a 12 por grupo). B - Níveis séricos de IL-1 β , IL-6 e TNF α 1 dia após CLP (N = 8 e 9 por grupo). Extraído de WEBER et al.....	33
Figura 4 – Fluxograma de inclusões	64
Figura 5 – Níveis circulantes de IL-3 nos dias 1, 3 e 7 de acordo com sobrevida hospitalar– Box plot	67
Figura 6 – Gráfico de barra – níveis séricos de IL-3 nos dias 1, 3 e 7 de acordo com sobrevida hospitalar.....	80
Figura 7 – Gráfico de linha – níveis séricos de IL-3 nos dias 1, 3 e 7 de acordo com sobrevida hospitalar.....	81
Figura 8 – Comportamento dos níveis de IL-3 durante os primeiros sete dias de sepse em sobreviventes e pacientes que faleceram durante internação hospitalar.....	81
Figura 9 – Curva ROC de citocinas, PCR, lactato e escores clínicos para o desfecho mortalidade hospitalar.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos pacientes à inclusão de acordo com mortalidade hospitalar.....	65
Tabela 2 – Características dos episódios de sepse e níveis de biomarcadores em sobreviventes e óbitos durante internação hospitalar	66
Tabela 3 – Níveis séricos de citocinas em pacientes sépticos que sobreviveram e que faleceram durante internação hospitalar	67

Tabela 4 – Mortalidade hospitalar ajustada para as co-variáveis APACHE II e PCR – Regressão logística	68
Tabela 5– Mortalidade hospitalar ajustada para as co-variáveis idade e SOFA sequencial – Análise de sobrevivência de Cox.....	68
Tabela 6 – Medidas de performance de modelos – Predição de mortalidade hospitalar	69
Tabela 7 – Valor P das análises de correlação entre IL-3 nos três tempos e demais variáveis contínuas avaliadas	70
Tabela 8 – Valor P das análises comparativas (Mann-Whitney U) dos níveis de IL-3 nos dias 1, 3 e 7 de acordo com ocorrência dos desfechos clínicos analisados	80

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1 - Formulário individual para registro das características clínicas e laboratoriais.....	94
Apêndice 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Paciente.....	101
Apêndice 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Familiar.....	105

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG	109
Anexo 2 – Folha de aprovação	110
Anexo 3 – Ata de defesa.....	111

SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	16
2. INTRODUÇÃO	19
3. REFERENCIAL TEÓRICO	22
3.1 – EPIDEMIOLOGIA DA SEPSE	22
3.2 – SEPSE: DEFINIÇÃO E CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS	24
3.3 – FISIOPATOLOGIA DA SEPSE	27
3.3.1 – Reconhecimento do patógeno e a resposta imune inata.....	27
3.3.2 – Resposta anti-inflamatória compensatória	29
3.3.3 – Disfunção orgânica na sepse	30
3.3.4 – Novas vias fisiopatológicas – Interleucina-3 e sepse.....	30
3.4 – TRATAMENTO DA SEPSE – PRINCÍPIOS GERAIS.....	33
3.5 – PREDITORES DE MORBIDADE E MORTALIDADE NA SEPSE	36
3.5.1 – Preditores clínicos e epidemiológicos.....	36
3.5.2 – Marcadores de disfunção orgânica	39
3.5.3 – Biomarcadores inflamatórios.....	41
4. JUSTIFICATIVA	48
5. OBJETIVOS.....	49
5.1 OBJETIVO GERAL.....	49
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
6.1 – Sujeitos da pesquisa e local do estudo.....	50
6.2 – Delineamento do estudo e população.....	50
6.3 – Cálculo amostral	52
6.4 – Coleta de dados.....	52
6.5 – Coleta e processamento de material biológico.....	54
6.6 – Análise estatística.....	55
7. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	57
8. CONCLUSÕES	78
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
11. APÊNDICES	94
12. ANEXOS	109

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) é um centro de atenção terciária referência em assistência a pacientes de alta complexidade, ensino, pesquisa e extensão no estado de Minas Gerais. Possui 547 leitos de internação, sendo 49 deles leitos de terapia intensiva para pacientes adultos. A Unidade de Cuidados Intensivos do Adulto (UCIA) conta com 18 leitos destinados a pacientes em pós-operatório e com condições críticas de caráter clínico. Os pacientes internados na UCIA são provenientes da unidade de pronto atendimento, das enfermarias e do bloco cirúrgico, além de outras unidades de internação do hospital e de Unidades de Pronto Atendimento (UPA) do município Belo Horizonte e do estado de Minas Gerais (HOSPITAL DAS CLÍNICAS UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, 2016).

Nos setores de terapia intensiva do HC-UFMG a prevalência de sepse é significativa. Aproximadamente 35% dos pacientes internados na UCIA apresentam-se inicialmente ou evoluem com sepse /choque séptico ao longo de sua internação na unidade (dados não publicados), número semelhante ao encontrado na literatura acerca do tema (VINCENT *et al.*, 2014; INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE, 2014). Apesar dos avanços na assistência, as taxas de morbimortalidade continuam elevadas neste grupo de pacientes, com enorme consumo de recursos. Dados levantados por pesquisadores revelam uma mortalidade hospitalar tão elevada quanto 57% nos pacientes com choque séptico internados em setores de terapia intensiva do hospital (QUE *et al.*, 2015). Além disso o uso frequente, prolongado e muitas vezes excessivo de antibióticos em terapia intensiva, motivado pela potencial gravidade dos pacientes e situações de incerteza diagnóstica, leva a aumento significativo nos índices de resistência bacteriana (HARBARTH, 2001; BELL *et al.*, 2014; KARAM *et al.*, 2016).

Neste contexto a linha de pesquisa em “Sepse, marcadores inflamatórios e antibioticoterapia” do Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical desenvolve estudos experimentais e clínicos em pacientes sépticos, com ênfase na avaliação da resposta imune inata e também no

estudo de biomarcadores. Diversas teses e dissertações já foram desenvolvidas nessa linha, notadamente na avaliação de biomarcadores que auxiliem no diagnóstico diferencial, na predição prognóstica e na condução terapêutica deste grupo de pacientes, tendo como objetivo em comum o desenvolvimento de técnicas que possam contribuir para a redução da exposição a antimicrobianos.

Nos últimos anos uma coorte prospectiva de pacientes sépticos vem sendo desenvolvida na UCIA, com a participação de pesquisadores e alunos de diferentes programas de pós-graduação da Faculdade de Medicina da UFMG. Com início em 2010, tal coorte vem ocorrendo de maneira sequencial, ramificada em diversos subprojetos, alguns deles já concluídos, originando até o momento uma defesa de dissertação, duas defesas de tese e uma colaboração com publicação de artigo.

Atualmente em sua terceira etapa, que teve início em outubro de 2014, esta coorte conta com minha participação juntamente com outras duas alunas doutorandas do programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical, com subprojetos que envolvem a avaliação de novos biomarcadores prognósticos na sepse, a avaliação de vias de sinalização celular relacionadas ao recrutamento e ativação de neutrófilos e a avaliação da função cardíaca em pacientes sépticos através da ecocardiografia *strain*. Nesta etapa, iniciada em outubro de 2014, contando com a ajuda de uma equipe bastante dedicada, tive a oportunidade de participar ativamente de todas as etapas do processo, realizando a organização logística da coorte, o acompanhamento de alunos de iniciação científica, o rastreamento diário por pacientes elegíveis, a coleta de material biológico, a coleta de dados e o acompanhamento clínico de todos os pacientes incluídos, com elaboração e organização do banco de dados e análises estatísticas iniciais. Além disso, pude acompanhar as análises laboratoriais realizadas por colaboradores de referência na área, assim como as análises estatísticas mais elaboradas, executadas com o auxílio de um estatístico colaborador do grupo. Mesmo após a conclusão deste subprojeto a coorte segue em andamento, contando agora com a participação de novos alunos e com colaborações com outros serviços e laboratórios de referência em estudo de inflamação do país. Esta coorte é desenvolvida pelo Núcleo

Interdisciplinar de Investigação em Medicina Intensiva (NIIMI), do qual faço parte. O NIIMI está cadastrado no Diretório de Grupos do CNPq e é um grupo pioneiro no desenvolvimento de pesquisa em medicina intensiva no estado de Minas Gerais e na UFMG, sendo “sepse e biomarcadores” uma de suas principais linhas de pesquisa.

Adicionalmente, no segundo semestre de 2015, tive a oportunidade de elaborar uma revisão narrativa sobre o valor prognóstico da procalcitonina (PCT) em infecções respiratórias, a convite de meu orientador. Tal atividade, apesar de não possuir ligação direta com o mestrado e o tema da minha dissertação, revelou-se extremamente enriquecedora, na medida em que permitiu o desenvolvimento de habilidades de busca por literatura, de interpretação e análise estatística e de elaboração de escrita científica. A revisão, intitulada “Prognostic value of procalcitonin in hospitalized patients with lower respiratory tract infections” foi publicada pela Revista Brasileira de Terapia Intensiva em junho de 2016.

2. INTRODUÇÃO

A concepção e a condução deste estudo ocorreram antes da publicação das novas definições de sepse, o denominado “Consenso Sepse 3” (SINGER *et al.*, 2016). Portanto, optamos por utilizar ao longo do texto as definições e os termos previstos nos consensos publicados anteriormente, em 1992 e 2002 (BONE *et al.*, 1992; LEVY *et al.*, 2002). Segundo este último, sepse é definida como uma resposta inflamatória sistêmica desencadeada por infecção suspeita ou confirmada, que pode evoluir para formas graves de disfunção orgânica aguda, caracterizando a sepse grave e o choque séptico (BONE *et al.*, 1992; LEVY *et al.*, 2002). Tais afecções apresentam grande relevância na saúde pública, acometendo milhões de pessoas a cada ano em todo o mundo. Com sua incidência se elevando progressivamente, quadros de sepse tem sido responsáveis por aumentos expressivos nos custos hospitalares, e por taxas de mortalidade constantemente elevadas apesar dos avanços nos campos de antibioticoterapia e terapia de ressuscitação (MARTIN *et al.*, 2003; ANGUS *et al.*, 2001).

No ambiente de terapia intensiva, casos de sepse e choque séptico são a causa líder de morbidade e mortalidade. Estudo recente em unidades de terapia intensiva brasileiras revelou frequência aproximada de 30% de tais casos, com mortalidade média de 55% (INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE, 2014). Apesar de numerosos esforços esta síndrome extremamente heterogênea possui mecanismos fisiopatológicos ainda pouco compreendidos (VAN DER POLL e OPAL, 2008). Além disso, pacientes com sepse tipicamente diferem em relação à apresentação clínica e à resposta ao tratamento. Considera-se, portanto, muito desejável a identificação de marcadores circulantes com sensibilidade e especificidade suficientes para auxiliar no diagnóstico, na determinação da gravidade da infecção e na predição de ocorrência de desfechos clínicos relevantes, com possível impacto em decisões terapêuticas. Esses marcadores poderiam auxiliar nas decisões relativas, por exemplo, à necessidade de controle de foco infeccioso e à duração da terapia antimicrobiana (PÓVOA e SALLUH, 2012; DUPUY *et al.*, 2013).

Mais de cem substâncias biológicas vêm sendo investigadas como biomarcadores na sepse (PIERRAKOS e VINCENT, 2010; VENTETUOLO e LEVY, 2008; SANKAR e WEBSTER, 2013). Dentre os mais disponíveis rotineiramente, proteína C reativa (PCR) e procalcitonina (PCT) têm se mostrado úteis no diagnóstico, apresentando boa relação com a carga bacteriana e na predição prognóstica da sepse (LISBOA *et al.*, 2008; PÓVOA *et al.* 2011; CHALMERS *et al.* 2008). Mais recentemente, alguns trabalhos, incluindo estudos do nosso grupo têm sugerido que esses marcadores são capazes de orientar a adequação do tratamento, podendo ser usados como guia na duração da terapêutica antimicrobiana (NOBRE *et al.*, 2008; BOUADMA *et al.*, 2010; HOCHREITER *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

O papel das citocinas pró-inflamatórias e da resposta inflamatória exacerbada na ocorrência de lesão tecidual, disfunção orgânica e morte em pacientes sépticos é historicamente conhecido. Dada sua relevante participação como mediadoras da sepse, citocinas como a interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e o *Tumor Necrosis Factor alfa* (TNF- α) foram estudadas como biomarcadores com potencial importância terapêutica. Infelizmente diversos ensaios clínicos com agentes bloqueadores de tais citocinas ou de vias de sinalização inflamatória tradicionalmente conhecidas apresentaram resultados desfavoráveis (ANGUS, 2011; EICHACKER *et al.*, 2002). Entretanto novas etapas da cascata inflamatória no contexto da sepse vêm sendo estudadas.

Em estudo recentemente publicado na revista Science, Weber e colaboradores demonstraram o papel da interleucina-3 (IL-3) na mielopoiese emergencial após a indução de sepse abdominal em modelo animal (WEBER *et al.*, 2015). IL-3 é uma citocina estimuladora de colônias hematopoiéticas multilinhagem, assim como o fator estimulador de colônias de monócitos e granulócitos (GM-CSF). Produzida por linfócitos T CD4+ e por células B ativadoras da resposta inata (IRA-B) atua em progenitores hematopoiéticos multipotentes através da via Jak/STAT, levando a sobrevivência e crescimento de tais células e consequente diferenciação celular (YANG *et al.*, 1986). Os dados experimentais revelam que a ausência desta citocina em modelo animal não traz qualquer prejuízo perceptível a hematopoiese em estado basal. Entretanto,

após indução de sepse abdominal, a ausência da IL-3 foi protetora, associada a menores índices de neutrofilia e monocitose, menores níveis de outras citocinas inflamatórias, melhor clearance bacteriano e menor taxa de disfunção orgânica e morte. De acordo com os resultados, a IL-3 seria responsável pela mobilização e proliferação de células mieloides no contexto da sepse, notadamente neutrófilos e monócitos inflamatórios, desencadeando a liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias e conseqüentemente inflamação sistêmica, disfunção orgânica e morte. Neste mesmo estudo os autores encontraram uma correlação entre níveis elevados de IL-3 e mortalidade em duas coortes de pacientes sépticos.

Os dados favoráveis acerca da utilidade da IL-3 como ferramenta para prever o prognóstico dos pacientes com sepse tornaram plausível a hipótese de que a avaliação qualitativa e, sobretudo, quantitativa do comportamento dessa molécula ao longo do curso inicial da sepse poderia fornecer informações úteis para a tomada de decisões referentes ao tratamento dos pacientes sépticos. Assim, a necessidade de controle de um eventual foco mantido, assim como a duração ideal do tratamento antimicrobiano poderiam ser mais bem definidos com o uso da IL-3. Nossa hipótese foi a de que o comportamento dos níveis séricos da IL-3 difere de forma significativa entre pacientes com boa e má resposta à terapia instituída no curso inicial da sepse, relacionando-se com persistência de disfunção orgânica, evolução para choque séptico e especialmente morte. Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade prognóstica da IL-3 sérica em pacientes com sepse e choque séptico internados em terapia intensiva, como marcador isolado ou na forma de um painel de biomarcadores.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 – EPIDEMIOLOGIA DA SEPSE

Sepse é uma síndrome multifatorial induzida por infecção considerada um grande problema de saúde pública em todo o mundo. Fatores como envelhecimento populacional, disseminação do uso de procedimentos e dispositivos invasivos, desenvolvimento de resistência a antimicrobianos e imunossupressão, seja esta induzida por terapia imunossupressora ou pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), estão relacionados ao aumento progressivo de sua incidência (ANGUS *et al.*, 2001; MARTIN *et al.*, 2003). Estudo que avaliou a epidemiologia da sepse nos Estados Unidos da América (EUA) nas últimas duas décadas do século XX (MARTIN *et al.*, 2003) revelou a ocorrência de mais de 10 milhões de hospitalizações por sepse em um período de 22 anos, com um aumento anual de 8,7% em sua incidência. Ainda que as taxas de mortalidade hospitalar neste período tenham caído de 27,8% para 17,9%, os números absolutos de morte estiveram em ascensão. Análise de custo realizada através de coleta de dados administrativos norte-americanos em 1995 revelou a ocorrência de 750.000 casos de sepse grave/choque séptico no ano, com mortalidade hospitalar de 28,6% e custo anual de \$16,7 milhões (ANGUS *et al.*, 2001). Dados mais recentes desse país reforçam o aumento progressivo da incidência de sepse grave em taxas de 13% ao ano (GAIESKI *et al.*, 2013). Dentre os sobreviventes, os altos índices de readmissão hospitalar e o declínio funcional a longo prazo aumentam ainda mais o impacto social e econômico da síndrome (IWASHYNA *et al.*, 2010). Readmissões hospitalares ocorrem em até 50% dos casos, com custos atribuídos de \$1,1 bilhão (GOODWIN *et al.*, 2015).

Estudos populacionais com informações epidemiológicas sobre o impacto global da sepse são escassos, especialmente em países em desenvolvimento. Por extrapolação de dados obtidos em países desenvolvidos, estima-se a ocorrência de 31,5 milhões de casos de sepse e 19,4 milhões de casos de sepse grave ao ano, com 5,3 milhões de mortes em potencial (FLEISCHMANN *et al.*, 2015). Em estudo publicado em 2014 Vincent e cols. avaliaram o perfil epidemiológico de unidades de terapia intensiva (UTIs) dos cinco continentes,

entretanto com representatividade do continente europeu superior a 50% dos pacientes. Sepsis esteve presente em 30% dos pacientes à admissão ou durante internação em terapia intensiva, com mortalidade hospitalar de 35,3%, superior à mortalidade de doentes críticos como um todo, estimada em 22,4% (VINCENT *et al.*, 2014).

No Brasil estudo epidemiológico desenvolvido em 2003 abrangendo 75 hospitais de todas as regiões do país apontou uma incidência de sepsis de 16,7% em UTIs, sendo a sepsis grave e o choque séptico as principais causas de óbito em terapia intensiva, com uma mortalidade global de 46,6%. Houve predominância de pacientes do sexo masculino (55,7%), com média de idade de 61,7 anos (ANDRADE *et al.*, 2006). Em análise retrospectiva de estudo prospectivo observacional realizado em dezenove instituições públicas e privadas brasileiras entre 2003 e 2004, com inclusão de 396 pacientes sépticos, as taxas de mortalidade hospitalar foram 60,9% e 47,1% para hospitais públicos e privados, respectivamente. Pacientes provenientes de instituições públicas tiveram maior número de disfunções orgânicas e maior chance de diagnóstico tardio, sendo a internação em instituição pública um fator de risco independente para mortalidade (CONDE *et al.*, 2013).

Dados preliminares disponíveis no site do Instituto Latino Americano de Sepsis (ILAS) revelam resultados de estudo multicêntrico observacional realizado recentemente em 229 UTIs brasileiras, com a inclusão de 794 pacientes. De acordo com o levantamento, 29,6% dos leitos das UTIs são ocupados por pacientes com sepsis grave ou choque séptico. A letalidade global estimada foi de 55%, com a região sudeste apresentando menores índices (51,2%), chegando a 70% na região centro-oeste. Neste estudo não foram encontradas diferenças de mortalidade entre hospitais públicos e privados (ILAS, Sepsis Prevalence Assessment Database, 2014). Em relatório gerencial divulgado recentemente pelo mesmo instituto foram analisados dados de todos os pacientes incluídos no banco que agrega dados de diversas UTIs, localizadas em praticamente todo o território brasileiro. Os dados correspondem ao período de 2005 a 2015, e incluem informações referentes a 32.694 pacientes internados tanto em instituições públicas quanto privadas brasileiras, com sepsis grave e choque séptico (**Figura 1**). A idade média dos

pacientes foi de 61 anos, sendo 52% do sexo masculino. Pneumonia foi o principal foco infeccioso, responsável por 53,4% dos casos, seguida por infecções do trato urinário com 18%. A maioria dos pacientes apresentou-se com sepse grave (62,8%), sendo este diagnóstico ainda mais prevalente dentre aqueles que foram tratados fora da terapia intensiva (84,5%). O tempo de disfunção orgânica previamente à administração do antimicrobiano foi de 5h em média em instituições públicas e de 1,3h em instituições privadas. A letalidade global em hospitais públicos foi de 57%, e de 32,9% em hospitais privados, perfazendo uma média de 42,2% no país nos últimos 10 anos. Evolutivamente houve um decréscimo importante da mortalidade entre os anos de 2005 e 2015 no setor privado, que foi de 51,6% para 28,6%. Infelizmente em instituições públicas a mortalidade, que em 2005 era de 62,5%, ainda foi superior a 50% em 2015 (ILAS – Relatório nacional 2005-2015. 2016).

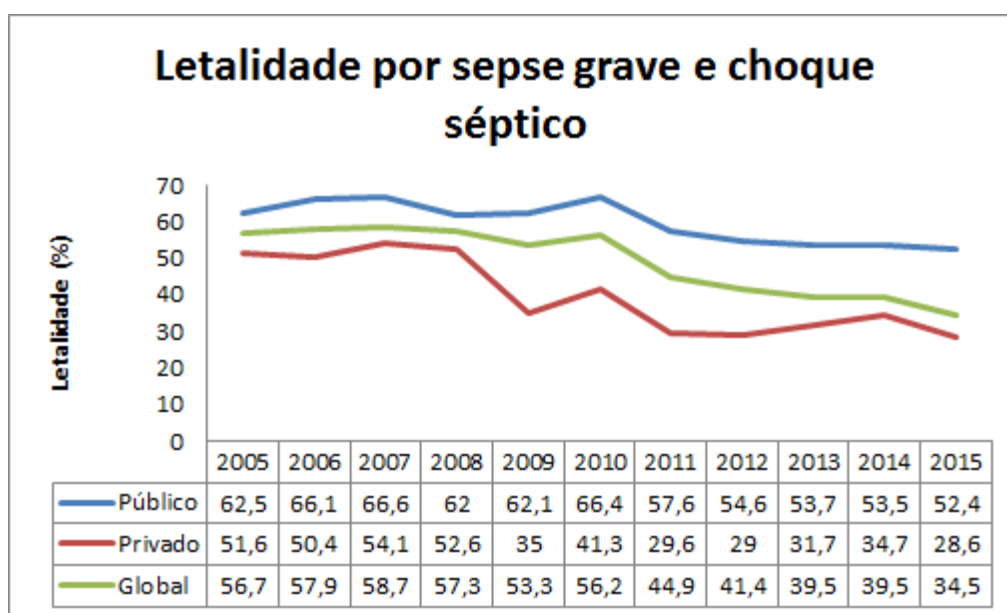


Figura 1 – Mortalidade anual por sepse grave e choque séptico – comparação entre dados de hospitais públicos e hospitais privados presentes no Banco de dados do ILAS de 2005 a 2015. Extraído do Relatório Nacional dos Protocolos Gerenciados de Sepse do Instituto Latino Americano de Sepse, ano 2016.

3.2 – SEPSE: DEFINIÇÃO E CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS

O termo sepse refere-se tradicionalmente a uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica secundária a uma agressão infecciosa. Presente há milhares de anos na literatura, inclusive em registros hipocráticos que datam o

período a.c., apenas na última década do século XX a terminologia utilizada para caracterização da síndrome passou por processo de padronização. Em conferência realizada em Chicago em agosto de 1991 pelo American College of Chest Physicians e pela Society of Critical Care Medicine, definições foram elaboradas com o objetivo de aumentar a capacidade diagnóstica, melhorar a padronização do cuidado ao paciente e facilitar pesquisas na busca por protocolos e novas intervenções terapêuticas (BONE *et al.*, 1992). O termo síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) foi proposto para a descrição do conjunto de achados clínicos e laboratoriais que refletiam uma resposta inflamatória de causa não específica, podendo ser secundária a uma grande variedade de insultos, infecciosos ou não. A SIRS foi definida como a presença de dois ou mais dos seguintes sinais:

- Temperatura corporal $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$;
- Frequência cardíaca > 90 bpm;
- Frequência respiratória > 20 irpm ou hiperventilação indicada por $\text{Pco}_2 < 32$ mmHg;
- Leucocitose ($>12.000/\text{mm}^3$) ou Leucopenia ($< 4.000/\text{mm}^3$) ou presença $> 10\%$ de formas imaturas de neutrófilos.

De acordo com as primeiras definições, quando a SIRS é resultado de um processo infeccioso confirmado, tem-se a sepse. Como infecção define-se um processo patológico causado pela invasão de tecidos, fluidos ou cavidades corporais normalmente estéreis por micro-organismos patogênicos ou potencialmente patogênicos.

Como a sepse possui um espectro clínico e fisiopatológico contínuo de gravidade, relacionado à ocorrência de disfunção orgânica e que está intimamente ligado ao seu prognóstico, estádios de gravidade foram definidos, sendo eles:

- Sepse grave: sepse associada a disfunção orgânica, alterações sugestivas de hipoperfusão (acidose láctica, oligúria e alteração do estado mental) e hipotensão (pressão sistólica < 90 mmHg ou redução > 40 mmHg em relação ao estado basal sem outra justificativa além da sepse).

- Choque séptico: hipotensão induzida pela sepse que persiste a despeito de ressuscitação volêmica adequada, juntamente com sinais de hipoperfusão e disfunção orgânica.

Em 2001 estas primeiras definições foram revisadas em uma conferência internacional composta por diversas sociedades norte-americanas e europeias (LEVY *et al.*, 2002). Objetivando aumento de chance de diagnóstico e tratamento mais precoces, portanto ainda priorizando a sensibilidade no diagnóstico, os termos sepse, sepse grave e choque séptico foram mantidos. Entretanto com a percepção de que tais categorias não permitiam um estadiamento claro do prognóstico destes pacientes e que o conceito de SIRS, apesar de útil, carecia de especificidade. Neste consenso a lista de sinais e sintomas de infecção foi ampliada, caracterizando-os como secundários a:

- SIRS: febre ou hipotermia, taquicardia, taquipneia, alteração do estado mental, hiperglicemia, edema;

- Inflamação: leucocitose, leucopenia, elevação de PCR e PCT;

- Perfusão tecidual: hiperlactatemia e redução da perfusão capilar periférica;

- Alterações hemodinâmicas: hipotensão arterial, hipoxemia, redução de saturação venosa central de oxigênio, oligúria, elevação de creatinina, alterações da coagulação, íleo, trombocitopenia, hiperbilirrubinemia.

Reforçou-se também a possibilidade de que infecção e sepse poderiam ser apenas fortemente suspeitas e não objetivamente documentadas, na ausência de confirmação microbiológica. Além disso um novo modelo de estadiamento foi proposto, considerando características individuais do paciente, dados microbiológicos, resposta inflamatória e ocorrência de disfunção orgânica – **P**redisposition, **I**nsult, **R**esponse e **O**rgan dysfunction (PIRO).

Em fevereiro de 2016 o terceiro consenso internacional, também composto por sociedades norte-americanas e europeias, trouxe novas definições de sepse e choque séptico (SINGER *et al.*, 2016). Baseado em dados disponíveis em ampla revisão de literatura desde 1992, as novas

definições simplificaram a nomenclatura e o termo “sepse” agora é definido como a presença de infecção já associada a disfunção orgânica, tendo sido extinto o termo “sepse grave”. A nova nomenclatura sugere os termos “infecção sem disfunção”, “sepse” e “choque séptico”. Além disso critérios de SIRS não são mais fundamentais para se definir sepse, considerando-se o número considerável de pacientes graves com sepse que não preenchem os critérios de SIRS (KAUKONEM *et al.*, 2015) e a falta de especificidade do termo. Entretanto a definição de disfunção orgânica para o diagnóstico da sepse passa a exigir alterações de pelo menos 2 (dois) pontos na avaliação do escore Sequential Organ Failure Assessment (SOFA), e a hiperlactatemia passou a ser exigida para a definição de choque séptico, com possibilidade de diagnóstico e seleção de um grupo já mais grave de pacientes. Tais definições, muito recentes, ainda estão em discussão em sociedades referência no estudo de sepse em âmbito global e, como discutido acima, não foram adotadas no presente estudo.

3.3 – FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

Sepse é uma síndrome complexa, multifatorial, cuja fisiopatologia ainda não foi completamente compreendida. A ideia tradicional, atrelada ao conceito de SIRS, de que qualquer disfunção orgânica associada à sepse é resultado de uma resposta inflamatória exacerbada e descontrolada não justifica todo o espectro da doença. Hoje sabemos que a resposta do hospedeiro ao insulto infeccioso envolve inúmeros mecanismos que vão além da fase pró-inflamatória, agindo de forma integrada, concomitante e muitas vezes antagônica através de diversas vias e mediadores (VAN DER POLL e OPAL, 2008). Evidências revelam que taxas mais altas de mortalidade estão associadas a níveis elevados de citocinas tanto pró quanto anti-inflamatórias (KELLUN *et al.*, 2007). Além disso outros fatores também contribuem para a instalação, evolução e desfecho do quadro, como carga bacteriana e grau de virulência do patógeno.

3.3.1 – Reconhecimento do patógeno e a resposta imune inata

Toxinas presentes nos patógenos e a resposta do hospedeiro a elas são responsáveis por grande parcela da lesão tecidual induzida pela sepse. Os

lipopolissacarides (LPS), tipo de endotoxina abundante na membrana celular de bactérias gram-negativo, ocupam um papel crucial na descrição da patogênese da sepse, e são classificados como um tipo de *pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs). Os PAMPs são descritos como componentes dos patógenos conservados, não sujeitos a mutação e não encontrados em organismos superiores, permitindo, portanto, o reconhecimento do patógeno pela resposta imune inata do hospedeiro (JANEWAY e MEDZHITOV, 1998). Apesar de sabidamente induzirem alto grau de lesão tecidual ao hospedeiro, os LPS, assim como outros PAMPs, não possuem em si atividades tóxicas intrínsecas. A toxicidade do LPS depende da resposta do hospedeiro a este mediador (VAN DER POLL e OPAL, 2008). PAMPs similares existem em vírus, fungos e bactérias gram-positivo, levando conseqüentemente a uma resposta imune de mesmo padrão (ULEVETCH e TOBIAS, 1999; VAN DER POLL e OPAL, 2008).

LPS ou outras partículas que os contenham, incluindo bactérias intactas, formam complexos com proteínas ligantes (LPS-binding protein – LBP), que através da interação cooperativa com a proteína CD4 - presente na membrana plasmática de células da linhagem mieloide ou em forma solúvel no plasma – e com receptores Toll-like (TLR) ativam rapidamente vias de sinalização de diferentes tipos celulares, tanto da linhagem mieloide - através da ligação ao CD14 da membrana celular - quanto da não mieloide - através da ligação a forma solúvel da CD14 (ULEVETCH e TOBIAS, 1999; HEUMANN e ROGER, 2002). Os TLRs são proteínas transmembrana que atuam como receptores do tipo “*pattern recognition receptors*” (PRRs) e reconhecem LPS e outros PAMPs, e quando ativados levam a ativação da resposta inflamatória (AKIRA *et al.*, 2006). As vias intracelulares de sinalização que são ativadas, homólogas à via de sinalização da interleucina 1 (IL-1), induzem liberação maciça de mediadores pró-inflamatórios, como interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 β (IL-1 β) e TNF α . Apesar de tal resposta hiperimune poder levar a destruição e remodelamento tissular pelos efeitos citotóxicos de tais citocinas, ela é crucial para o controle inicial do processo infeccioso (HEUMANN e ROGER, 2002; AKIRA *et al.*, 2006), especialmente até que uma resposta imunológica específica seja elaborada.

3.3.2 – Resposta anti-inflamatória compensatória

O conceito fisiopatológico pró-inflamatório exclusivo da sepse passou a ser questionado a partir do momento em que terapias anti-inflamatórias inovadoras apresentaram resultados desfavoráveis em inúmeros ensaios clínicos. Agentes bloqueadores de TLR-4 e de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β , foram desenvolvidos baseando-se nos efeitos citotóxicos das mesmas como principais causadores das disfunções orgânicas da sepse, e apresentaram resultados favoráveis em nível de estudo celular e em modelos animais. Entretanto tais intervenções não demonstraram qualquer benefício em relação a desfechos clínicos em pacientes com sepse ou SIRS (FREEMAN e NATANSON, 2000; EICHACKER, 2002; ANGUS, 2011), revelando a existência de processos patológicos adicionais de alta complexidade (ABRAHAM, 1997).

Em 1997 Roger Bone propôs o termo “*compensatory anti-inflammatory response syndrome*” (CARS) para descrever o conceito de autoimunossupressão que ocorria na sepse, a semelhança da resposta anti-inflamatória já sabidamente existente em pacientes cirúrgicos e grandes queimados (BONE *et al.*, 1997; GENTILE *et al.*, 2012). A CARS reflete um estado de imunossupressão desencadeado pela agressão infecciosa que inclui elementos clínicos e moleculares. Clinicamente caracteriza-se por anergia cutânea, hipotermia, leucopenia, susceptibilidade a infecções e falência ao tratamento das mesmas. Do ponto de vista celular e molecular, observa-se apoptose linfocitária, disfunção linfocitária (redução da proliferação ou produção de citocina por linfócitos T helper tipo 1 [Th1] em resposta a estímulo específico), redução da produção de citocinas por monócitos após estimulação dos mesmos, *down-regulation* de receptores HLA em monócitos e produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e *transforming growth factor* beta (TGF- β) (BONE *et al.*, 1997; WARD *et al.*, 2008). A CARS é uma síndrome que inicialmente produz efeitos benéficos ao limitar os danos causados por uma resposta inflamatória exacerbada, entretanto pode se tornar deletéria na medida em que se perpetua além do necessário, aumentando a vulnerabilidade do hospedeiro a inúmeros patógenos.

3.3.3 – Disfunção orgânica na sepse

Apesar de extensamente estudados, os mecanismos responsáveis pela disfunção orgânica na sepse ainda não foram completamente compreendidos. De maneira semelhante a falência de múltiplos órgãos (FMO) que ocorre em pacientes vítimas de politrauma, a ativação do sistema imune inato com liberação excessiva de mediadores pró e anti-inflamatórios e a baixa oxigenação tecidual possuem papel central (CHAN *et al.*, 2012).

Rico em receptores de importantes mediadores inflamatórios como TNF α e IL-1, o endotélio pós capilar perde sua integridade no contexto da sepse devido a morte celular e alterações na junção endotelial (GOLDENBERG *et al.*, 2011). O edema cavitário e subcutâneo que se segue prejudica ainda mais a oxigenação tecidual já instalada, consequência da hipotensão sistêmica associada a redução da maleabilidade das hemácias e a trombose microvascular (ANGUS e VAN DER POLL, 2013). Anormalidades diversas da coagulação contribuem para um estado trombogênico na sepse. A expressão de fator tecidual por diversos tipos celulares e a disfunção de proteína C, da antitrombina e do sistema fibrinolítico levam ao excesso de deposição de fibrina. O surgimento de trombos é ainda facilitado pela formação das *neutrophil extracellular traps* (NETs), rede liberada após a morte celular de neutrófilos. A hipercoagulabilidade agrava ainda mais a disfunção endotelial através de receptores ativados por protease (PAR) do subtipo 1, que quando expostos a altas doses de trombina desencadeiam perda da junção endotelial (ANGUS e VAN DER POLL, 2013). Adicionalmente o estresse oxidativo gerado pela hipoperfusão tecidual leva a redução da utilização celular de oxigênio em nível mitocondrial.

3.3.4 – Novas vias fisiopatológicas – Interleucina-3 e sepse

Ensaio terapêuticos e experiências clínicas que avaliaram o bloqueio de citocinas inflamatórias, de vias de sinalização e/ou do reconhecimento do patógeno no tratamento da sepse foram universalmente insatisfatórios (FREEMAN e NATANSON, 2000; EICHACKER, 2002; ANGUS, 2011). Entretanto, recentemente, um grupo de cientistas americanos e alemães demonstrou experimentalmente que o bloqueio de uma citocina até então não

estudada na sepse, a interleucina-3 (IL-3), poderia de fato ser protetor (HOTCHKISS e SHERWOOD, 2015). Em estudo publicado pela revista *Science* em 2015, Weber e cols. revelaram que em modelo animal a IL-3 é a citocina responsável pela mielopoiese emergencial de monócitos e neutrófilos na sepse, o que desencadeia a cascata de citocinas inflamatórias, especialmente IL-1 β , IL-6 e TNF α , e as lesões orgânicas consequentes a ela (WEBER *et al.*, 2015).

IL-3 é uma citocina estimuladora de colônias hematopoiéticas multilinhagem, assim como o fator estimulador de colônias de monócitos e granulócitos (GM-CSF). Produzida por linfócitos T CD4+ e também por células B ativadoras da resposta inata (IRA-B) atua em progenitores hematopoiéticos multipotentes através de seu receptor, que possui uma cadeia α específica (CD123) e uma cadeia β comum (CD131), e da via Jak/STAT, levando a sobrevida e crescimento de tais células e consequente diferenciação celular (YANG *et al.*, 1986; ABBAS *et al.*, 2012). Dados acerca de sua cinética são escassos na literatura, entretanto indicam meia-vida em torno de 30 minutos (GARLAND *et al.*, 1983; GUBA *et al.*, 1989).

Nesse estudo (WEBER *et al.*, 2015) camundongos *knockout* para IL-3 (*Il3*^{-/-}) apresentaram níveis normais de monócitos e neutrófilos, indicando que essa citocina não seria responsável pela mielopoiese em seu estado basal. Camundongos *Il3*^{-/-} e controles selvagens foram então submetidos a *cecal ligation and puncture* (CLP) como modelo de sepse abdominal polimicrobiana, e submetidos a avaliações clínicas, moleculares, celulares e histopatológicas diversas. Em comparação com o grupo controle, camundongos *Il3*^{-/-} apresentaram menor taxa de mortalidade mesmo após tratamento antimicrobiano (**Figura 2**), apresentando melhores escores clínicos e dados vitais, além de *clearance* bacteriano mais efetivo, demonstrando que a ausência de IL-3 não prejudicou o reconhecimento ou atividade bactericida.

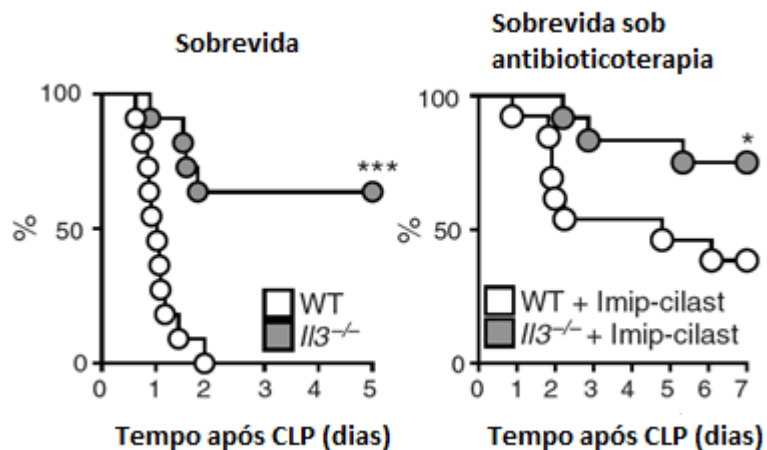


Figura 2 – Comparação entre camundongos selvagens (WT) e Il3^{-/-} após sepse experimental induzida por CLP no estudo de Weber et al. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier em camundongos sem antibioticoterapia (n = 10 por grupo) e sob antibioticoterapia (n = 12 e 13 por grupo). Extraído de WEBER et al., 2015. CLP: Cecal ligation and puncture; WT: Wild Type; Il3^{-/-}: knockout para IL-3; Imip-cilast: Imipenem e cilastatina; * p < 0,05; *** p < 0,001.

Após CLP, camundongos selvagens apresentaram neutrofilia e monocitose, acompanhadas por altos níveis de produção de IL-1 β , IL-6 e TNF α , enquanto que em camundongos Il3^{-/-} os níveis de monócitos e neutrófilos permaneceram praticamente inalterados (**Figura 3A e Figura 3B**). O reservatório intracelular das três citocinas inflamatórias era semelhante entre camundongos selvagens e Il3^{-/-}, mostrando que os menores níveis dessas citocinas em camundongos Il3^{-/-} era indiretamente causado pelas menores quantidades de fagócitos produtores das mesmas. Além disso, camundongos selvagens, mas não Il3^{-/-}, apresentaram acúmulo de neutrófilos e monócitos em pulmão e fígado, com conseqüentes alterações funcionais e morfológicas típicas da sepse e choque séptico.

A expansão de progenitores de granulócitos e monócitos após indução de sepse provou-se IL-3 dependente através de experimentos *in vivo* com marcação de progenitores por proteínas fluorescentes nos dois grupos de animais e de experimentos *in vitro* com células progenitoras, IL-3 e LPS.

Nestes experimentos *in vitro* a IL-3 e não o LPS foi a grande responsável pela expansão celular mieloide, especialmente quando em associação com o LPS, levando a grande quantidade de produção de IL-1 β , IL-6 e TNF α por estas células. *In vivo*, além da comprovação da expansão celular IL-3 dependente, os pesquisadores identificaram que a IL-3 *per se* não desencadeia a cascata de citocinas da sepse, mas o faz quando associada à realização de CLP. Por fim, camundongos controles submetidos a CLP tratados com anticorpo anti-CD123 apresentaram uma modesta, mas significativa redução da mortalidade, reforçando o eixo IL-3/CD123 como um possível alvo terapêutico na sepse.

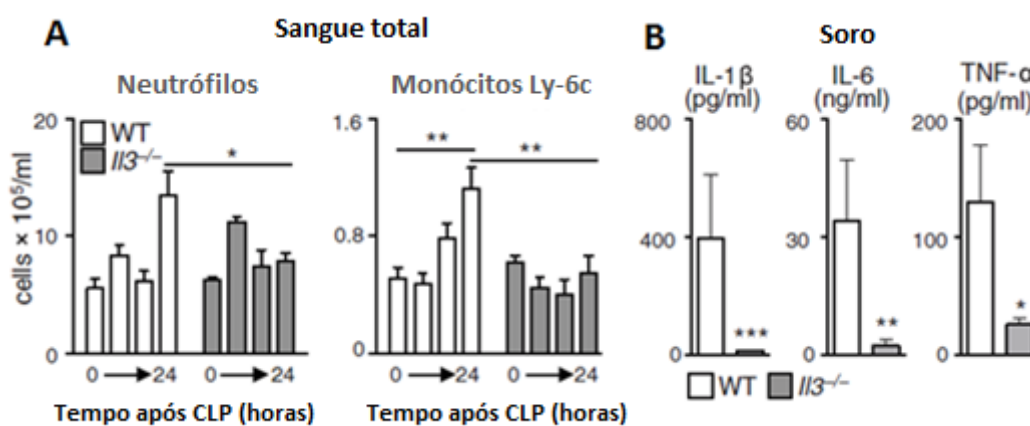


Figura 3 – Comparação entre camundongos selvagens (WT) e IL3^{-/-} após sepse experimental induzida por CLP no estudo de Weber *et al.* A - Dosagem de neutrófilos e monócitos Ly-6c em 1 mililitro de sangue em 0, 6, 12 e 24 horas após CLP (n = 3 a 12 por grupo). B - Níveis séricos de IL-1 β , IL-6 e TNF α 1 dia após CLP (N = 8 e 9 por grupo). Extraído de WEBER *et al.*, 2015. CLP: *Cecal ligation and puncture*; WT: *Wild Type*; IL3^{-/-}: *knockout* para IL-3; Ly-6C: antígeno de diferenciação mieloide; IL-1 β : interleucina 1 beta; IL-6: interleucina 6; TNF α : Fator de necrose tumoral; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

3.4 – TRATAMENTO DA SEPSE – PRINCÍPIOS GERAIS

Apesar de avanços nos estudos da fisiopatologia da sepse nos últimos anos, tais conhecimentos ainda não foram traduzidos em novas terapias eficazes contra alvos fisiopatológicos específicos. Até o momento o diagnóstico precoce associado à instituição de antibioticoterapia apropriada e de medidas

de ressuscitação em tempo hábil são os pilares do tratamento da sepse, com maior impacto no desfecho clínico dos pacientes.

Em 2006 Kumar e cols. publicaram estudo de coorte retrospectivo conduzido em UTIs canadenses e americanas ao longo de cinco anos. Nesse estudo o tempo de hipotensão antes da administração de antimicrobiano foi o mais forte preditor isolado de mortalidade hospitalar em pacientes com choque séptico (KUMAR *et al.*, 2006). Cada hora de atraso na administração do antimicrobiano ao longo das primeiras seis horas de hipotensão foi associada à redução de 7,6% na sobrevida hospitalar. Pacientes que receberam antibioticoterapia apropriada na segunda hora apresentaram um aumento significativo no risco de morte em relação àqueles que receberam antibiótico na primeira hora, com OR de 1,67 (95% IC 1,12 – 2,48). Apesar dos achados, apenas 50% dos pacientes haviam recebido antibiótico nas primeiras seis horas de hipotensão. Em análise de tratamento de pacientes com choque séptico e também com sepse grave, a adesão ao pacote de medidas que inclui a administração da antibioticoterapia nas primeiras três horas de atendimento esteve relacionada a menor taxa de mortalidade hospitalar em 218 centros de atendimento nos Estados Unidos, Europa e América do Sul. Centros com alta adesão ao pacote de medidas apresentaram mortalidade de 29%, *versus* 38,6% daqueles locais que possuíam baixa adesão ao protocolo (LEVY *et al.*, 2015).

Em relação à ressuscitação volêmica, estudo prospectivo randomizado unicêntrico publicado em 2001 demonstrou que o tratamento inicial agressivo de pacientes com sepse grave e choque séptico direcionado por metas nas primeiras seis horas de tratamento estava relacionado à diminuição da mortalidade (RIVERS *et al.*, 2001). Tais metas compreendiam parâmetros de perfusão representados por valores de pressão venosa central, pressão arterial média, hematócrito e saturação venosa central de oxigênio. Dentre os 263 pacientes incluídos no estudo, aqueles submetidos à terapia direcionada por metas apresentaram mortalidade hospitalar de 30,5%, comparada com mortalidade de 46,5% no grupo controle, diferença estatisticamente significativa.

Com base nestes e em outros trabalhos que demonstravam o início precoce do tratamento como um dos pontos cruciais para a redução da mortalidade na sepse foi desenvolvido um guia estratégico com objetivo inicial de reduzir a mortalidade pela sepse em 25% em cinco anos, através de medidas que envolveriam a melhoria no diagnóstico, a educação de profissionais, o desenvolvimento de diretrizes de tratamento e a implementação de programas institucionais. Com sua primeira edição publicada em 2004 o *Surviving Sepsis Campaign Guidelines (SSCG)* propôs medidas de reconhecimento e tratamento da sepse divididas em dois pacotes de tratamento, um deles dentro das primeiras seis horas (fase de reposição) e o outro dentro das primeiras 24 horas (fase de manutenção) (DELLINGER *et al.*, 2004). Atualmente em sua terceira edição (DELLINGER *et al.*, 2013) a diretriz reforça a necessidade de administração precoce de antibióticos efetivos em até uma hora após o reconhecimento da sepse grave e choque séptico, o rastreamento e controle do foco infeccioso, a ressuscitação volêmica precoce com cristaloides e o suporte hemodinâmico com aminas como os pontos cruciais do tratamento, apesar de pequena força de evidência disponível acerca da ressuscitação volêmica até sua data de publicação. Reforça-se também na diretriz a avaliação diária de descalonamento antimicrobiano guiado por culturas e outros exames complementares como estratégia para a redução de resistência bacteriana. Outros pontos do tratamento, como o controle estrito da glicemia e o uso de corticoides em adultos foram reavaliados, e o uso da dotrecogina alfa retirado como uma opção terapêutica.

Recentemente três ensaios clínicos multicêntricos randomizados foram realizados avaliando a real eficácia e também a necessidade da realização de todos os passos do protocolo de ressuscitação direcionado por metas proposto por Rivers em 2001 (The ProCESS Investigators, 2014; The ARISE Investigators, 2014; The ProMISe Trial Investigators, 2015). Com delineamentos parecidos, os três ensaios encontraram resultados semelhantes, que eram discrepantes em relação àqueles publicados por Rivers. Assim, segundo esses estudos, a instituição rigorosa de um protocolo baseado em metas de pressão venosa central, pressão arterial média, hematócrito e saturação venosa central não estava relacionada a melhor prognóstico em

pacientes admitidos no pronto atendimento com choque séptico, desde que a identificação da sepse seja precoce e os pacientes recebam ressuscitação hemodinâmica e antibioticoterapia intravenosa adequadas. A análise conjunta dos três estudos demonstrou resultados semelhantes (ANGUS *et al.*, 2015).

3.5 – PREDITORES DE MORBIDADE E MORTALIDADE NA SEPSE

A predição prognóstica de pacientes com sepse é de fundamental importância. Dados clínicos e laboratoriais podem ser usados para otimizar a condução terapêutica dos pacientes em relação à instituição de antibioticoterapia e ressuscitação volêmica precoces. Podem auxiliar também em decisões acerca do local de tratamento, da necessidade de realização de procedimentos invasivos, do controle mais agressivo de um foco infeccioso e do tempo de tratamento antimicrobiano. Para isso tanto marcadores clínicos quanto laboratoriais deveriam ser precoces e acurados o suficiente para fornecerem informações acerca do risco de desfechos desfavoráveis logo nas primeiras horas de evolução.

3.5.1 – Preditores clínicos e epidemiológicos

Fatores epidemiológicos como raça e sexo parecem possuir impacto no desfecho clínico de pacientes com sepse. Em estudo epidemiológico realizado em hospitais de urgência norte-americanos de 1979 a 2003 pacientes negros e de outras raças apresentaram maior risco de desenvolvimento de disfunção orgânica na sepse se comparados a caucasianos (37% vs. 29%, $p < 0,01$), assim como homens apresentaram risco ligeiramente aumentado em relação a mulheres (32% vs. 29%, $p = 0,02$) (ESPER *et al.*, 2006). No estudo epidemiológico de Angus e cols. as taxas de mortalidade por sepse grave e choque séptico foram significativamente maiores em homens do que em mulheres (29,3% vs. 27,9%, $p < 0,001$) (ANGUS *et al.*, 2001). Em outro estudo desenhado para analisar as disparidades raciais na evolução da sepse grave pesquisadores encontraram uma incidência de sepse grave 67% mais elevada em negros após ajuste de dados para sexo e idade, com uma mortalidade também 80% superior nesta população (MAYR *et al.*, 2010). A maior incidência de comorbidades que afetam o sistema imunológico na população negra e em

homens podem justificar as diferenças encontradas (ESPER *et al.*, 2006; ANGUS *et al.*, 2001).

Outros preditores de disfunção orgânica além de sexo e raça incluem idade, *status* imunológico e comorbidades. Idade mais avançada se correlaciona com gravidade da sepse em inúmeros estudos. Em estudo prospectivo que avaliou o padrão inflamatório de pacientes sépticos nas primeiras 72 horas de internação pacientes com idade acima de 65 anos apresentavam valores mais elevados de IL-1 e TNF α à admissão, assim como maior incidência de sepse grave e choque séptico se comparados a pacientes com idade entre 18 e 34 anos (71% vs. 41%, $p < 0,001$) (GINDE *et al.*, 2014). Nos principais estudos epidemiológicos em sepse realizados nos Estados Unidos no final do século XX, idade se mostrou um importante fator relacionado a óbito na sepse, com taxas de mortalidade variando de 10% na infância para 38,4% acima dos 85 anos (ANGUS *et al.*, 2001). No estudo de Martin e cols. taxas de mortalidade na sepse aumentaram linearmente em relação a idade, sendo a idade um preditor independente de mortalidade após ajustes por fatores como comorbidades e sítios de infecção, com OR de 2,26 (IC95% 2,17-2,36) (MARTIN *et al.*, 2006).

A presença de algumas comorbidades como câncer, imunodeficiência adquirida, diabetes, doença renal crônica e etilismo podem influenciar a evolução de pacientes com sepse (ANGUS *et al.*, 2001). No estudo epidemiológico realizado por Esper e cols. 30% dos pacientes sépticos que possuíam apenas uma comorbidade desenvolveram disfunção orgânica, comparado com 39% dos pacientes com duas comorbidades e 45% dos pacientes com três ou mais comorbidades (ESPER *et al.*, 2006). Pacientes com câncer possuem risco aumentado de adquirir infecções e sepse em comparação com a população geral, assim como risco aumentado de morte na sepse. Em estudo publicado em 2006 que avaliou a epidemiologia da sepse em pacientes com neoplasias malignas a presença de câncer foi um preditor independente de morte hospitalar na sepse, com OR de 1,98 (IC 95% 1,97 – 1,99) (DANAI *et al.*, 2006).

A apresentação clínica do paciente no momento do diagnóstico da sepse pode trazer alguns elementos que auxiliem na predição prognóstica do mesmo. Os componentes da SIRS possuem isoladamente baixa especificidade para identificar pacientes sépticos com risco de evolução para sepse grave, choque séptico ou óbito. Análise de fatores de risco para mortalidade hospitalar em uma coorte de 3.608 pacientes infectados internados em terapia intensiva revelou que as taxas de mortalidade não foram afetadas pelo número de critérios de SIRS apresentados pelos pacientes, e que pacientes categorizados como infectados sem SIRS apresentaram mortalidade semelhante a pacientes com sepse (infecção associada a SIRS) (ALBERTI *et al.*, 2003). Em outro estudo que elaborou um escore de predição de risco para desenvolvimento de disfunção orgânica na sepse, também em terapia intensiva, das doze variáveis independentemente associadas ao risco de evolução desfavorável, apenas duas delas fazem parte da definição de SIRS, sendo elas a febre e a taquicardia (ALBERTI *et al.*, 2005). Em setores de urgência um escore clínico validado para a estratificação de risco de pacientes infectados considerou, dentre nove variáveis independentemente associadas a piores desfechos, apenas dois dos critérios de SIRS, a taquipneia e a presença de formas jovens de leucócitos em sangue periférico, como indicadores de mau prognóstico (SHAPIRO *et al.*, 2003). Em análise de dados coletados em 172 UTI da Austrália e Nova Zelândia de 2000 a 2013, pacientes com sepse grave que não preenchiam os critérios de SIRS apresentaram taxas de mortalidade ao longo dos anos semelhantes às de pacientes com sepse grave com critérios de SIRS. Neste mesmo estudo a mortalidade se elevou linearmente de acordo com a presença adicional de cada um dos critérios de SIRS, sem um incremento adicional de risco a partir do valor de corte de dois critérios (KAUKONEM *et al.*, 2015). Mais recentemente análises de dados clínicos de milhares de pacientes infectados foram realizadas em força-tarefa para a definição dos novos critérios de sepse publicados em 2016. Dentre os pacientes infectados, internados em terapia intensiva ou não, a presença de SIRS apresentou um valor de predição para mortalidade hospitalar inferior a todas as outras ferramentas de predição avaliadas, com AUC de 0,64 (IC 95% 0,62 – 0,66, $P < 0,001$) para aqueles em UTI e de 0,76 (IC 95% 0,75-0,77, $p < 0,001$) para aqueles fora da terapia intensiva (SEYMOUR *et al.*, 2016).

3.5.2 – Marcadores de disfunção orgânica

A ocorrência de disfunção orgânica está tradicionalmente relacionada ao prognóstico na sepse, estando presente na categorização e estratificação dos pacientes desde a primeira definição de sepse em 1992 (BONE *et al.*, 1992). A definição seguinte, de 2002, manteve a categoria sepse grave como sendo um espectro de maior gravidade da doença relacionado à ocorrência de disfunção orgânica, seja definida pela Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos (MODS) ou pelo escore *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) (LEVY *et al.*, 2003). Apesar destas ferramentas guardarem uma boa correlação com mortalidade em terapia intensiva, não são específicas de pacientes sépticos.

A síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, caracterizada pelo desenvolvimento progressivo de disfunção de dois ou mais órgãos ou sistemas é responsável por 80% das mortes em terapia intensiva e possui a infecção como seu principal fator causal. As variáveis incluídas na definição da síndrome foram definidas por seu caráter objetivo, reproduzível e de fácil mensuração em diferentes grupos de pacientes, sendo elas: disfunção respiratória avaliada pelo índice de oxigenação; disfunção renal avaliada pelo nível sérico de creatinina; disfunção hepática avaliada pelo nível sérico de bilirrubina; disfunção cardiovascular avaliada através de uma composição da frequência cardíaca, pressão venosa central e pressão arterial média; disfunção hematológica avaliada pelo nível de plaquetopenia; e disfunção neurológica avaliada pela Escala de Coma de Glasgow (MARSHALL *et al.*, 1995). Já o escore SOFA utiliza critérios semelhantes à MODS, acrescentando-se a mensuração da diurese aos valores de creatinina para avaliação de disfunção renal, e simplificando a avaliação da disfunção cardiovascular. Neste escore a detecção de hipotensão arterial e a necessidade de aminas vasoativas são os componentes da disfunção cardiovascular. Inicialmente criado como sendo *Sepsis-related Organ Failure Assessment*, considera a disfunção orgânica como um evento de espectro evolutivo que deve ser avaliado através de uma escala de gravidade contínua, individualizando cada órgão ou sistema, e não apenas como uma síndrome que possa estar presente ou ausente (VINCENT *et al.*, 1996). Como vantagem adicional o SOFA guarda boa correlação prognóstica em pacientes críticos quando realizado de forma

seriada. Valores iniciais acima de 11 correlacionaram-se em 80% com mortalidade em pacientes internados em terapia intensiva em um hospital universitário na Bélgica, e independentemente dos valores iniciais, aumento no SOFA nas primeiras 48 predisso mortalidade acima de 50% nesse grupo de pacientes (FERREIRA *et al.*, 2001).

Vários indicadores de disfunção orgânica já foram relacionados ao prognóstico de pacientes sépticos, isoladamente ou em conjunto, em diversos estudos clínicos. Em estudo conduzido em diversas UTIs pelo *European Sepsis Group* a presença de qualquer disfunção orgânica que categorizasse o paciente como tendo sepse grave aumentou sua probabilidade de óbito hospitalar, com uma hazard ratio (HR) de 1,53 ($p < 0,001$), enquanto a presença de choque séptico apresentou uma HR de 2,64 ($p < 0,001$) para o mesmo desfecho (ALBERTI *et al.*, 2003). Em pacientes infectados atendidos em setores de emergência, a presença de hipoxemia, plaquetopenia, confusão mental e choque correlacionou-se independentemente com mortalidade hospitalar, com OR de 2,7 (IC 95% 1,6 – 4,3), 2,5 (IC 95% 1,5 – 4,3), 1,6 (IC 95% 1 – 2,6) e 2,7 (IC 95% 1,2 – 5,7), respectivamente (SHAPIRO *et al.*, 2003).

Outro marcador de disfunção orgânica e hipoperfusão significativamente associado a mortalidade na sepse e com boa performance prognóstica é o lactato sérico, também utilizado como guia terapêutico e alvo de ressuscitação. Em pacientes admitidos em setores de emergência com infecção suspeita, níveis de lactato associaram-se à mortalidade medida aos 28 dias, e valores de lactato ≥ 4 mmol/l em pacientes normotensos determinaram taxas de mortalidade semelhantes às observadas em pacientes que apresentaram hipotensão refratária (HOLWELL *et al.*, 2007). Em outro estudo que também avaliou pacientes com sepse grave em setores de urgência, níveis iniciais de lactato elevados associaram-se à mortalidade independentemente da presença de outras disfunções orgânicas evidentes ou de choque, com OR de 4,87 ($p < 0,001$) (MIKKELSEN *et al.*, 2009).

Na mais ampla e recente avaliação de critérios clínicos que apresentassem real impacto prognóstico em pacientes sépticos, o escore SOFA apresentou performance superior à SIRS e ao escore *Quick SOFA*

(qSOFA) na predição de mortalidade hospitalar em pacientes internados em terapia intensiva, com AUC de 0,74 (IC 95% 0,73 - 0,76), semelhante a apresentada pelo complexo sistema Logistic Organ Dysfunction System (LODS), sendo portanto selecionado como critério diagnóstico de sepse neste grupo de pacientes. Em pacientes fora da terapia intensiva o escore qSOFA, composto pelas variáveis hipotensão sistólica ($PAS \leq 100\text{mmHg}$), taquipneia ($FR \geq 22$ irpm) e alteração do estado mental, apresentou melhor predição prognóstica. A presença de dois ou mais destas alterações correlacionou-se com mortalidade hospitalar com uma AUC de 0,81 (IC 95% 0,8 – 0,82) (SEYMOUR *et al.*, 2016). Na avaliação de pacientes com choque séptico, aqueles que demandaram o uso de aminas vasopressoras para a manutenção de uma pressão arterial média $\geq 65\text{mmHg}$ e apresentaram um valor de lactato ≥ 2 mmol/l após ressuscitação volêmica tiveram uma mortalidade hospitalar de 42,3% (IC 95% 41,2% - 43,3%), significativamente maior do que a apresentada pelos pacientes que apresentavam apenas um ou nenhum desses critérios (SHANKAR-HARI, 2016).

3.5.3 – Biomarcadores inflamatórios

A avaliação clínica, epidemiológica e o uso de marcadores de disfunção orgânica são amplamente utilizados e possuem importância prática na predição prognóstica de pacientes críticos com sepse. Entretanto, taxas de mortalidade ainda elevadas revelam a necessidade de otimização do cuidado ao paciente séptico. Neste sentido a utilização de biomarcadores inflamatórios pode auxiliar na condução terapêutica e na definição de intervenções em busca de melhoria de sobrevida neste grupo de pacientes. Idealmente um bom biomarcador prognóstico deve acrescentar informações à avaliação clínica isolada e refletir em tempo hábil mudanças que ocorram no curso da doença, como uma boa resposta ao tratamento instituído. Adicionalmente deve possuir custo acessível e ser de mensuração fácil, ágil e objetiva. (MARSHALL *et al.*, 2003; MARSHALL *et al.*, 2009).

Inúmeras moléculas relacionadas à resposta inflamatória e à infecção já foram estudadas como marcadores prognósticos na sepse, como citocinas, quimiocinas, receptores solúveis e proteínas de fase aguda. Dentre os de maior

utilidade na prática clínica podemos citar a PCR e a PCT, além de citocinas inflamatórias como a IL-6 (PIERRAKOS e VINCENT, 2010; VENTETUOLO e LEVY, 2008; SANKAR e WEBSTER, 2013).

A PCR é uma proteína de fase aguda produzida por hepatócitos e macrófagos alveolares em resposta a uma variedade de citocinas inflamatórias, especialmente a IL-6. Suas concentrações se elevam aproximadamente seis horas após o estímulo inflamatório, com pico entre 36 e 50 horas. Após a eliminação ou remoção do estímulo seus níveis caem rapidamente, com meia-vida de aproximadamente 19 horas (POVOA, 2002). Apesar da baixa especificidade, alterando-se em uma diversidade de condições não-infecciosas como politrauma, pós-operatório, doenças inflamatórias sistêmicas e neoplasias, sua cinética favorável associada à técnica de mensuração bem padronizada, facilmente disponível e de baixo custo fazem da PCR um biomarcador amplamente utilizado em pacientes sépticos (VENTETUOLO e LEVY, 2008). Entretanto, ainda assim a PCR possui limitações na predição de prognóstico na sepse (PIERRAKOS e VINCENT, 2010).

Em estudo multicêntrico realizado em 31 UTIs belgas valores de PCR à admissão acima de 100mg/L se relacionaram independentemente à ocorrência de disfunções orgânicas e à mortalidade hospitalar em uma população mista de pacientes críticos (LOBO *et al.*, 2003). Em comparação com pacientes que apresentavam valores de PCR à admissão < 10mg/L, aqueles com valores acima de 100mg/L apresentaram maior incidência de disfunção respiratória (65% vs. 28,8%, $p < 0,05$) e renal (16,6% vs. 3,6%, $p < 0,05$), de coagulopatia (6,4% vs. 0,9%, $p < 0,05$) e maior taxa de mortalidade (36% vs. 21%, $p < 0,05$). Dentre aqueles com valores iniciais acima de 100mg/L a queda dos níveis de PCR nas 48 horas seguintes associou-se a menores taxas de mortalidade em comparação àqueles que apresentaram concentrações ascendentes desse marcador (15,4% vs. 60,9%, $p < 0,05$), $RR=0,25$ (IC 95% 0,07-0,91; $p < 0,05$).

Em uma população específica de pacientes infectados pesquisadores brasileiros encontraram associação entre cinética da PCR e sobrevida em 75 pacientes com pneumonia associada a ventilação mecânica (PAVM) internados na UTI de um hospital universitário (SELIGMAN *et al.*, 2006). Queda nos

valores de PCR entre os dias 0 e 4 associou-se à sobrevida com OR de 3,78 (IC 95% 1,24-11,5; p 0,02). Essa associação permaneceu significativa em análise multivariada com OR de 7,4 (IC 95% 1,58-34,73; p 0,01). Outro estudo que avaliou o papel prognóstico da PCR em pacientes internados em terapia intensiva com PAVM em dois centros universitários revelou uma correlação positiva entre níveis de PCR e carga bacteriana, tanto entre valores iniciais ($p = 0,46$; $p < 0,05$) quanto nas variações dos mesmos ao longo da terapia antimicrobiana. Além disso a queda nos níveis de PCR após 96 horas de tratamento foi um importante indicador de adequação de terapia antimicrobiana (LISBOA *et al.*, 2008).

Já em pacientes internados com pneumonia adquirida na comunidade (PAC), estudo com 570 pacientes demonstrou que valores de PCR < 100 mg/L à admissão estavam associados à menor taxa de mortalidade aos 30 dias com OR 0,18 (IC 95% 0,04-0,85; $p = 0,03$), e que pacientes que não apresentavam queda da PCR em ao menos 50% nos primeiros quatro dias apresentavam taxas de mortalidade mais elevadas (OR 24,5, IC 95% 6,4 – 93,4; $p < 0,0001$), assim como maior necessidade de suporte ventilatório e inotrópico e maior taxa de complicações, como abscesso e empiema (CHALMERS *et al.*, 2008). O papel prognóstico da PCR na PAC foi também avaliado em um estudo multicêntrico com 891 pacientes internados em terapia intensiva. Não foram encontradas diferenças significativas entre valores iniciais de PCR em sobreviventes e óbitos hospitalares, entretanto níveis sequenciais de PCR a partir do terceiro dia de acompanhamento diferiram significativamente nas duas populações. A taxa de declínio da PCR nos cinco primeiros dias foi fortemente relacionada à mortalidade hospitalar mesmo após ajuste para as variáveis APACHE II e gravidade da sepse (PÓVOA *et al.*, 2011). Mais recentemente pesquisadores sul-coreanos avaliaram retrospectivamente a utilidade prognóstica da PCR em uma coorte de pacientes sépticos (com sepse grave e choque séptico). Valores iniciais de PCR não se associaram significativamente à falência de tratamento no sétimo dia ou à mortalidade aos 28 dias. Entretanto o *clearance* de PCR entre dias 1 e 7 associou-se significativamente à falência terapêutica ($p = 0,030$) e apresentou AUC para predição de mortalidade aos 28 dias de 0,77 (IC 95% 0,67 – 0,88) (RYU *et al.*, 2015).

Outro biomarcador extensamente estudado na predição prognóstica de pacientes sépticos é a PCT. A PCT é um precursor do neurohormônio calcitonina envolvido na resposta imune, atuando em uma variedade de estímulos inflamatórios como infecções, traumas, cirurgias, queimaduras, pancreatite, entre outros. Apesar de se alterar em resposta a inúmeros insultos inflamatórios, a PCT vem se mostrando um marcador mais específico de infecções bacterianas graves (VENTETUOLO e LEVY, 2008; GIAMARELLOS-BOURBOULIS *et al.*, 2002).

Em coorte prospectiva desenvolvida com 61 pacientes críticos com sepse suspeita, valores de PCT no segundo dia após inclusão apresentaram um bom valor discriminativo na predição de mortalidade hospitalar, com AUC de 0,777 (IC 95% 0,599-0,954; $p = 0,003$), valor semelhante ao do escore APACHE II (AUC 0,786; IC 95% 0,663 – 0,909) (PETTILÄ *et al.*, 2002). Outro estudo desenvolvido por Jansen e cols. em uma amostra maior de pacientes avaliou o valor da mensuração diária de PCT em 472 pacientes críticos. Valores iniciais de PCT > 1 ng/mL ou sua elevação acima deste valor nos dias sequenciais foram preditores independentes de morte aos 90 dias em análise multivariada, ao contrário dos níveis de PCR e leucócitos. Além disso o risco de morte aumentou proporcionalmente ao número de dias em que a PCT manteve-se elevada (JANSEN *et al.*, 2006). Já em pacientes cirúrgicos com sepse valores de PCT no terceiro dia após admissão em terapia intensiva mostraram bom poder discriminativo na predição de morte aos 28 dias (AUC = 0,78), entretanto não superior ao escore SOFA (DAHABA *et al.*, 2006). Em outro estudo com amostra também de tamanho limitado, 45 pacientes com PAVM foram acompanhados prospectivamente e avaliados quanto à performance da PCT e PCR sequenciais em prever mortalidade aos 28 dias e evolução para choque séptico. Pacientes que faleceram apresentaram valores de PCT significativamente mais elevados nos dias 1 e 7, e a queda nos valores de PCT entre os dias 1 e 7 foi preditora de sobrevida em análise multivariada (OR 7.23; IC 95% 0,008–0,468, $P = 0,007$). Entretanto a queda da PCT entre os dias 1 e 4, que possuiria maior significado clínico, não apresentou associação com mortalidade. Neste estudo nenhum dos dois biomarcadores foi preditor de choque séptico (HILLAS *et al.*, 2010).

Seligman e cols. também avaliaram prospectivamente valores sequenciais de PCT em pacientes com PAVM, e demonstraram que a queda nos valores de PCT entre os dias 0 e 4 foi, juntamente com a queda da PCR, o único preditor independente de sobrevida aos 28 dias, com OR de 4,43 (IC 95% 1,08-18,18, $p = 0,04$) (SELIGMAN *et al.*, 2006). A medida sequencial de PCT demonstrou maior acurácia para ocorrência de óbito do que sua mensuração isolada em estudo prospectivo multicêntrico realizado em UTIs na Finlândia com 242 pacientes com sepse grave e choque séptico (KARLSSON *et al.*, 2010). Não foram encontradas diferenças nos valores de PCT entre óbitos e sobreviventes à internação hospitalar, entretanto a mortalidade foi significativamente menor naqueles pacientes que apresentaram queda da PCT em mais de 50% nas primeiras 72 horas, com mortalidade de 12,2% vs. 29,8% ($p = 0,007$). Também no estudo retrospectivo de RYU e cols. mudanças nas concentrações de PCT entre primeiro e sétimo dia de tratamento foram significativamente associadas à falência terapêutica em pacientes com sepse grave e choque séptico (RYU *et al.*, 2015).

Apesar de resultados claramente promissores, ainda é discutível qual o real impacto destes biomarcadores no manejo de pacientes sépticos, e sobretudo quanto eles poderiam acrescentar à avaliação clínica habitual, levando-se em conta a utilização rotineira de escores clássicos, como o SOFA e o APACHE II (MARSHALL e REINHART, 2009; PIERRAKOS e VINCENT, 2010; DUPUY *et al.*, 2013). Mais recentemente vários ensaios clínicos têm demonstrado que esses biomarcadores podem ser bastante úteis como guias de duração de terapia antimicrobiana, com objetivo de reduzir tempo de exposição a antibióticos naqueles pacientes que apresentam diagnósticos diferenciais mais plausíveis ou apresentam boa resposta clínica ao tratamento (PÓVOA e SALLUH, 2012; NOBRE *et al.*, 2008; BOUADMA *et al.*, 2010; HOCHREITER *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Um estudo multicêntrico Holandês, publicado em 2016, sugeriu que além de permitir a redução da utilização de antibióticos, o uso da PCT como guia para suspensão de antibioticoterapia associou-se à redução da mortalidade aos 28 dias e em um ano de acompanhamento de pacientes críticos com infecção suspeita ou confirmada (DE JONG *et al.*, 2016).

Inúmeros estudos vêm sendo realizados com o objetivo de encontrar novos biomarcadores que possam fornecer informações suficientemente acuradas sobre o risco de ocorrência de desfechos desfavoráveis logo nas primeiras horas de avaliação e manejo do paciente séptico. Até o momento inúmeras citocinas já foram estudadas na sepse com objetivo semelhante, como IL-6, interleucina-8 (IL-8), interleucina-10 (IL-10) e TNF α , entretanto a grande maioria em estudos de pequeno porte com resultados pouco promissores (PIERRAKOS e VINCENT, 2010).

Em estudo publicado em 1993 pesquisadores avaliaram níveis séricos das citocinas TNF α , IL-1, interleucina-2 (IL-2), IL-6 e interferon gama (INF- γ) em 52 pacientes com choque em UTI, sendo 35 deles com choque séptico, nas primeiras 48 horas de evolução do choque. Níveis de TNF α e IL-6 em pacientes com MODS e naqueles que faleceram foram significativamente mais elevados, tanto em pacientes sépticos quanto não sépticos (PINSKY *et al.*, 1993). Em outro estudo que avaliou pacientes sépticos em comparação a doentes críticos não sépticos e controles saudáveis, níveis de TNF, IL-1 β e IL-6 foram significativamente mais elevados em pacientes sépticos do que nos demais grupos, e níveis de IL-6 foram 69% mais elevados naqueles que faleceram em 30 dias em comparação com sobreviventes (IC 95% 30% - 108%) (CASEY *et al.*, 1993). No estudo de Pettila e cols. desenvolvido com 61 pacientes críticos com suspeita de sepse, valores de IL-6 à admissão e no segundo dia após inclusão apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os sobreviventes e aqueles que faleceram durante a internação hospitalar. Além disso níveis de IL-6 no dia 2 de seguimento apresentaram bom valor discriminativo na predição de mortalidade hospitalar, com AUC de 0,799 (IC 95% 0,638-0,959) (PETTILÄ *et al.*, 2002). Um estudo multicêntrico que avaliou amostra mais significativa, com inclusão de 124 pacientes com sepse grave e choque séptico, traçou o perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias e testou a associação desses moléculas com a ocorrência de disfunção orgânica e mortalidade aos 28 dias. Níveis iniciais de IL-6 foram significativamente associados à mortalidade aos 28 dias, e se correlacionaram de maneira significativa aos escores APACHE II e MODS (OBERHOLZER *et al.*, 2005).

Até o momento apenas um estudo publicado avaliou o possível valor prognóstico da dosagem de IL-3 em pacientes sépticos. Os mesmos pesquisadores que determinaram seu papel fisiopatológico em ensaios experimentais *in vivo* e *in vitro* avaliaram se seus achados poderiam ser reproduzidos em seres humanos (WEBER *et al.*, 2015). Para tal, foram analisadas duas coortes de pacientes sépticos: uma coorte retrospectiva, com 60 pacientes e uma coorte prospectiva, com 37 pacientes. Na primeira coorte níveis de IL-3 nas primeiras 24 horas de evolução da sepse acima de 87,4 pg/ml associaram-se significativamente à mortalidade aos 28 dias ($p = 0,01$). Na segunda coorte valores acima de 89,4 pg/ml também se correlacionaram significativamente a esse desfecho ($p = 0,03$). Em análise conjunta dos 97 pacientes, valores elevados de IL-3 nas primeiras 24 horas (acima de 89,4 pg/ml) estiveram relacionados a maior mortalidade aos 28 dias com OR de 4,979 (IC 95%: 1,680-14,738; $p = 0,001$). Tal associação manteve-se significativa em análise multivariada, com a IL-3 acrescentando informação prognóstica a variáveis classicamente utilizadas para tal fim, como idade, SOFA, APACHE II e SAPS 3.

4. JUSTIFICATIVA

Apesar de inúmeros esforços em busca de melhores resultados no seu tratamento, sepse e choque séptico permanecem entre as principais causas de morte em terapia intensiva, com custos sociais e financeiros muito elevados. Devido à heterogeneidade da síndrome, seu diagnóstico precoce e a estratificação de risco dos pacientes acometidos ainda representam um desafio, com consequências diretas na instituição de um tratamento adequado. A predição prognóstica precoce na sepse é de fundamental importância, pois auxilia a individualização da propedêutica e da terapêutica, as quais serão progressivamente mais intensivas quanto pior for o prognóstico previsto para um determinado paciente. Neste sentido a utilização de biomarcadores que acrescentem informações objetivas ao julgamento clínico e, portanto, auxiliem na tomada de decisões é uma estratégia promissora. Inúmeros deles já foram extensamente estudados.

Recentemente um novo biomarcador foi proposto como potencialmente útil na sepse. Trata-se da IL-3, um fator estimulador de colônia de granulócitos, que parece exercer papel pró-inflamatório fundamental na fisiopatologia da sepse, e níveis séricos elevados desta citocina parecem estar relacionados a pior prognóstico. De acordo com a revisão realizada na base de dados Medline em agosto de 2015, apenas um estudo publicado avaliou o impacto dos níveis séricos de IL-3 no desfecho de pacientes sépticos. Esse estudo foi essencialmente de caráter experimental, e os dados clínicos apresentados resumiram-se a análises de duas pequenas coortes de pacientes sépticos. Contudo, os dados clínicos e, sobretudo, os resultados experimentais encontrados tornaram plausível a hipótese de que a avaliação qualitativa e quantitativa da IL-3 ao longo do curso inicial da sepse, como marcador isolado ou na forma de um painel de biomarcadores, poderia fornecer informações úteis para a tomada de decisões referentes ao tratamento dos pacientes sépticos. Portanto, consideramos justificável a realização deste estudo.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o valor prognóstico da IL-3 sérica em pacientes com sepse e choque séptico internados em terapia intensiva.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a associação entre os níveis circulantes de IL-3 e os seguintes desfechos:
 - Desfecho primário: mortalidade hospitalar
 - Desfechos secundários: mortalidade em 28 dias e em terapia intensiva; ocorrência de choque e de outras disfunções orgânicas agudas; duração de internação em terapia intensiva e no hospital.
- Traçar o perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias (Th1, Th2 e Th17) nos pacientes incluídos no estudo, especificamente IL-2, Interleucina-4 (IL-4), IL-6, IL-10, TNF α , IFN- γ e interleucina-17 (IL-17), avaliando a associação dos seus níveis séricos com desfechos clínicos supracitados.
- Correlacionar os níveis séricos da IL-3 com as demais citocinas estudadas.
- Correlacionar os níveis séricos da IL-3 e das demais citocinas estudadas com os níveis séricos de PCR e com a contagem de leucócitos totais.
- Avaliar a associação entre os níveis séricos da IL-3 e demais citocinas estudadas com variáveis demográficas (sexo e idade), presença de comorbidades, resultado de culturas microbiológicas (positiva ou negativas; bactérias gram-negativo ou gram-positivo) e valor dos escores clínicos SOFA e APACHE II.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 – Sujeitos da pesquisa e local do estudo

Este estudo foi conduzido na Unidade de Cuidados Intensivos do Adulto (UCIA) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) em Belo Horizonte. A unidade possui dezoito leitos, destinados ao atendimento de pacientes em pós-operatório ou com condições críticas de caráter clínico. Os pacientes internados na UTI são procedentes da unidade de pronto atendimento, das enfermarias ou do bloco cirúrgico deste hospital, além de outras unidades de pronto atendimento do estado ou município.

Todos os pacientes adultos (idade ≥ 18 anos), com sepse suspeita ou confirmada, diagnosticada há menos de 48 horas, internados na UTI do Hospital das Clínicas da UFMG, foram considerados para potencial inclusão. O *screening* de pacientes potencialmente elegíveis para o estudo foi feito pela pesquisadora principal, mediante visitas diárias à unidade.

6.2 – Delineamento do estudo e população

Este foi um estudo de coorte ambispectiva (*ambi-directional cohort study*). Os critérios de inclusão dos pacientes foram:

- Idade ≥ 18 anos
- Pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (permitiu-se assinatura por um familiar ou responsável, caso o paciente não estivesse consciente ou com condições de discernimento adequadas).
- Paciente com suspeita clínica ou com confirmação microbiológica de sepse. Os pacientes deveriam apresentar no mínimo 2 de 4 critérios de SIRS: temperatura corporal $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$; frequência cardíaca > 90 bpm; frequência respiratória > 20 irpm ou hiperventilação indicada por $\text{Pco}_2 < 32$ mmHg; e leucocitose ($> 12.000/\text{mm}^3$) ou leucopenia ($< 4.000/\text{mm}^3$) ou presença $> 10\%$ de formas imaturas de neutrófilos. Deveriam apresentar também evidência de disfunção orgânica relacionada a infecção, indicada por um ou mais dos seguintes: PAS < 90 mmHg ou PAM < 65 mmHg; queda da PAS > 40 mmHg em relação ao basal; infiltrado pulmonar bilateral com nova ou

aumentada demanda de oxigênio suplementar para manter $SpO_2 > 90\%$; infiltrado pulmonar bilateral com $PaO_2/FiO_2 < 300$; creatinina > 2 mg/dl ou diurese $< 0,5$ ml/kg/h por > 2 h; bilirrubina total > 2 mg/dl; plaquetas $< 100.000/mm^3$; coagulopatia (RNI $> 1,5$ ou PTTa > 60 s); lactato > 2 mmol/L.

A suspeita de sepse foi definida como a expressão clara da suspeita de uma condição infecciosa grave por parte dos médicos assistentes, associada ao início de tratamento antimicrobiano e à realização de propedêutica direcionada ao esclarecimento da provável infecção.

Sepse confirmada foi definida pela documentação microbiológica de uma infecção grave, devendo-se assim haver o isolamento de pelo menos um micro-organismo considerado patogênico, não mais do que 48 horas antes da inclusão no estudo, e para o qual os médicos assistentes tivessem direcionado a terapêutica antimicrobiana.

Os pacientes incluídos foram classificados como tendo sepse grave ou choque séptico, de acordo com as definições do consenso "Sepse 2" (LEVY *et al.*, 2002).

Os critérios de exclusão de pacientes neste estudo foram:

- Uso de antibióticos supostamente ou comprovadamente eficazes contra o processo infeccioso em questão por mais de 48 horas;
- Pacientes sob cuidados paliativos;
- Pacientes com expectativa de óbito para as primeiras 24 horas ou que tenham falecido neste período;
- Pacientes imunossuprimidos graves: portadores de HIV com linfócitos $CD4^+ < 200/mm^3$; pacientes em terapia imunossupressiva pós-transplante de órgãos sólidos ou de medula óssea; pacientes neutropênicos (abaixo de 500 neutrófilos/ mm^3 ou abaixo de 1000/ mm^3 com tendência a queda); pacientes que tivessem sido submetidos à quimioterapia nos últimos 28 dias ou a outras terapias imunossupressoras; pacientes em uso crônico de corticoide em doses imunossupressoras (equivalente a 10mg/dia de prednisona por ≥ 30 dias ou 40mg de prednisona por ≥ 10 dias).
- Paciente vítima de politrauma nos últimos 5 (cinco) dias.

- Paciente submetido à cirurgia de grande porte nos últimos 5 (cinco) dias (permitida inclusão de pacientes submetidos a cirurgia para controle do foco infeccioso).

6.3 – Cálculo amostral

Pelo nosso conhecimento, há apenas um estudo publicado na literatura acerca do uso da IL-3 como marcador prognóstico na sepse (WEBER *et al.*, 2015). Nesse trabalho, em que a maior parte dos dados foi obtida em modelos experimentais, a avaliação dos níveis de IL-3 em 97 pacientes (dados retrospectivos de uma coorte prospectiva previamente publicada com 60 pacientes e dados prospectivos de uma nova coorte com 37 pacientes) revelou que a IL-3 associa-se à mortalidade mensurada ao 28º dia de seguimento em pacientes portadores de sepse grave ou choque séptico. Considerando-se o valor de corte de 89,4 pg/ml, 38% dos pacientes que faleceram apresentavam IL-3 acima desses níveis, comparados com 11% dos pacientes que sobreviveram, com odds ratio de 4,9 na curva de sobrevivida (Kaplan Meier). A mortalidade global aos 28 dias neste estudo foi de 37,1%. Em uma primeira fase de nossa coorte, a mortalidade aos 28 dias foi de 27,8%. Considerando-se a frequência de IL-3 positivo (> 89,4 pg/ml) em sobreviventes e em pacientes que faleceram até o 28º dia no estudo citado e a razão de alocação de 0,38 desses dois subgrupos de pacientes em nossa coorte retrospectiva (ie, 1 óbito para cada 2,6 sobreviventes), seriam necessários 95 sobreviventes e 36 óbitos ao 28º dia para que encontrássemos diferença estatística entre os dois grupos. Como o desfecho primário analisado em nosso estudo foi mortalidade hospitalar, ajustou-se o cálculo considerando a taxa de mortalidade hospitalar de 32,9% em uma primeira fase de nossa coorte. Assim, seriam necessários 40 óbitos e 81 sobreviventes a internação hospitalar (total de 121 pacientes) para detectarmos diferença estatística entre esses dois subgrupos com poder de 95% e erro alfa de 5%.

6.4 – Coleta de dados

Os pacientes incluídos foram acompanhados desde a admissão na UTI (ou imediatamente após o diagnóstico de um episódio de sepse ou choque

séptico diagnosticado durante a internação na unidade) até a alta hospitalar, ou até o óbito, caso este tenha ocorrido durante a internação.

Utilizou-se questionário padronizado para coleta de dados referentes às informações laboratoriais e clínicas, as quais foram obtidas prospectivamente, e digitadas em banco de dados criado utilizando-se o programa EpiData versão 3.1. As variáveis coletadas foram:

- Idade (anos);
- Sexo (masculino, feminino);
- Presença de comorbidades, com diagnóstico prévio descrito em prontuário (insuficiência cardíaca sistólica ou em classe funcional NYHA \geq II; doença pulmonar obstrutiva crônica confirmada; cirrose hepática; insuficiência renal crônica dialítica e não dialítica; hipertensão arterial sistêmica; diabetes mellitus; infecção pelo HIV; neoplasia sólida ou hematológica);
- Tipo de internação (leito de origem clínico ou cirúrgico);
- Tipo infecção (comunitária, nosocomial)
- Foco infeccioso (pulmonar, abdominal, urinário, por cateter, pele e partes moles, sistema nervoso central, misto, indeterminado);
- Escores de gravidade SOFA (dias 1, 3 e 7) e APACHE II;
- Exames laboratoriais de rotina em terapia intensiva (níveis de hemoglobina, leucócitos totais, neutrófilos, bastonetes, eosinófilos, plaquetas, lactato arterial, PCR, ureia, creatinina, pH, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativado, alanino aminotransferase, aspartato aminotransferase);
- Ocorrência de disfunções orgânicas (PAS < 90mmHg ou PAM < 65mmHg; queda da PAS > 40mmHg em relação ao basal; infiltrado pulmonar bilateral com nova ou aumentada demanda de oxigênio suplementar para manter SpO₂ > 90%; infiltrado pulmonar bilateral com PaO₂/FiO₂ < 300; creatinina > 2 mg/dl ou diurese < 0,5ml/kg/h por > 2h; bilirrubina total > 2mg/dl;

plaquetas < 100.000/mm³; coagulopatia (RNI > 1,5 ou PTTa > 60s); lactato > 2mmol/L) e necessidade de terapias de substituição orgânica (aminas vasoativas, inotrópicos, ventilação mecânica, terapia substitutiva renal);

- Presença de febre (TAX > 38°C) e resolução da mesma;

- Dados microbiológicos (confirmação microbiológica, positividade de hemocultura ou outras culturas; tipo de germe isolado e perfil de sensibilidade);

- Utilização de antimicrobianos (classes, drogas, tempo de uso);

- Tempo de internação hospitalar (dias) e em terapia intensiva (dias).

6.5 – Coleta e processamento de material biológico

As amostras de soro foram obtidas a partir do sangue coletado para os exames da rotina diária da terapia intensiva. Para este estudo, utilizaram-se amostras de sangue coletadas no dia da inclusão (dia 1) e nos dias 3 e 7 de seguimento. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm, 4°C, por 10 minutos para separação do soro. A parte referente ao soro foi alíquotada e congelada em freezer -80 °C até o momento das análises. A dosagem de IL-3 e demais citocinas foi realizada em um segundo momento em colaboração com o Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da UFMG (LIIM).

A dosagem de IL-3 foi realizada pelo método de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando-se o Human IL-3 DuoSet Elisa kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), conforme instruções do fabricante. As leituras foram feitas por um leitor de microplacas ajustado para 490nm. As dosagens das citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17 foram realizadas pelo método de CBA, conforme instruções do fabricante (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Utilizaram-se os kits para quantificação de proteínas inflamatórias (*Human Th1/Th2/Th17* - IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17). Brevemente, as amostras de soro foram incubadas com as microesferas de captura recobertas por anticorpos específicos para as respectivas citocinas e quimiocinas, assim como as proteínas da curva padrão. Adicionou-se em seguida o reagente de cor (Ficoeritrina - PE) e as amostras foram incubadas

por 3h. Após a incubação, as amostras foram lavadas (Wash buffer®) e centrifugadas (200 rpm, 5 minutos, temperatura ambiente). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado contendo as microesferas foi novamente suspenso com 300µL de Wash buffer. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA). Os resultados foram analisados pelo software FCAP (BD Bioscience) e representados em pg/mL.

6.6 – Análise estatística

Variáveis categóricas são apresentadas de acordo com sua frequência absoluta e relativa. Média e desvio padrão foram utilizados para apresentação de variáveis contínuas de distribuição normal; e mediana e intervalo interquartilico para variáveis contínuas de distribuição não normal. Comparações entre variáveis categóricas foram feitas através do teste de chi-quadrado ou teste exato de Fisher. Variáveis contínuas foram comparadas pelos testes t Student ou Mann-Whitney U, de acordo com tipo de distribuição. Correlações entre variáveis contínuas foram feitas utilizando-se o teste de correlação de Spearman. Curvas ROC foram construídas para estabelecer a acurácia das moléculas estudadas em prever os desfechos analisados. Fatores prognósticos influenciando os desfechos em estudo foram inicialmente avaliados em modelos de análise univariada e aqueles com um valor P menor que 10%, foram avaliados através de análise multivariada. Fatores como plausibilidade clínica também foram considerados na construção do modelo multivariado. Foram empregados modelos de regressão logística para os desfechos categóricos, regressão linear para as variáveis contínuas e análise dos riscos proporcionais de Cox para as variáveis dependentes de tempo, ajustadas para variáveis potencialmente explicativas dos desfechos analisados. Modelos de predição foram comparados através de medidas de desempenho de modelo, sendo elas:

- Análises de concordância: fração de pares na amostra em que as observações com maior tempo de sobrevivência têm a maior probabilidade predita pelo modelo. Quanto maior a concordância, melhor o modelo.

- Estatística R^2 : mensuração do poder explicativo das covariáveis no tempo de ocorrência do evento em estudo. Quanto maior o valor de R^2 , melhor o modelo.

- Medida AIC (Akaike Information Criteria): Medida de qualidade do modelo. É melhor aquele modelo com o menor valor de AIC.

Teste bicaudal e valor de significância de p de 0,05 foram definidos para todas as análises. Os dados foram armazenados em um banco de dados do programa EpiData versão 3.1 e analisados utilizando-se os pacotes estatísticos SPSS versão 20.1 (SPSS, Chicago, IL) e R versão 3.1.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Para conferência dos dados coletados foram reverificados os dados que estavam além de dois desvios padrão.

7. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

As seções Resultados e Discussão serão apresentadas na forma de um manuscrito que está sendo preparado para publicação, conforme abaixo.

Title: Circulating levels of interleukin-3 as prognostic marker in sepsis

Authors: Isabela Borges¹, Carolina Resende¹, Érica Vieira², José Luiz Padilha³, Marcus Vinícius M. Andrade⁴, Andrea Souza¹, Eurípedes Badaró¹, Antônio Lúcio Teixeira Jr^{1,2}, Vandack Nobre¹ **on Behalf of the Núcleo Interdisciplinar de Investigação em Medicina Intensiva - NIIMI**

Afiliações: 1- Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Departamento de Clínica Médica, School of Medicine and Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; 2- Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; 3- Departamento de Estatística, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; 4- Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Saúde do Adulto, Departamento de Clínica Médica, School of Medicine and Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Corresponding author:

Isabela Borges

Departamento de Clínica Médica, 2º andar Faculdade de Medicina

Av. Alfredo Balena, 190, Santa Efigênia, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Tel/fax: +55(31)3409-9746

isabelanborges@hotmail.com

Abstract: A recent study has shown that interleukin 3 (IL-3) plays a key role in the pathophysiology of sepsis, and that high levels of this cytokine predict poor prognosis. The aim of this study was to evaluate the IL-3 prognostic role in patients with sepsis admitted to the intensive care unit. The primary outcome was all-cause hospital mortality. To this end, an ambispective cohort was conducted in the Intensive Care Unit of the Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. Adult patients with sepsis leading to at least one organ dysfunction initiated within the previous 48 hours were included and followed up until hospital discharge or death. Circulating IL-3 levels were measured upon study inclusion (day 1) and on day 3 and day 7. Additionally we assessed the levels of pro and anti-inflammatory cytokines (profiles Th1, Th2 and Th17) at time of inclusion. One hundred and twenty patients were included from October / 2012 to January / 2016, and 83% of them had septic shock. The average age of the population was 55 (\pm 18) years and 68 (57%) patients were male. The baseline APACHE II and SOFA scores were 17 (Q1-Q3: 12-22) and 8 (Q1-Q3: 6-11), respectively. The mortality observed after 28 days, in the ICU, and in the hospital was 24%, 22.5% and 34%, respectively. Serum levels of IL-3 measured on day 1 were significantly higher among patients who died compared with patients who survived at hospital discharge (91.2 pg / ml vs 36 pg / ml, $p = 0.024$). Initial values of IL-3 above 127.5 pg / ml were significantly associated with hospital mortality ($p = 0.019$; OR = 2.97, 95% CI 1.27 to 6.97). This association remained in a multivariate analysis ($p = 0.01$) adjusted for APACHE II and C reactive protein. In Cox survival model considering the IL-3 levels measured at inclusion, patient's age and sequential values of SOFA, IL-3 values remained independent associated with mortality ($p = 0.005$). Finally, when tests to measure the performance to predict hospital mortality were applied, the model with IL-3 was considered superior as compared to those without this marker. The levels of IL-6 and IL-10 measured on day 1 were also significantly higher among patients that died in the hospital. There were no differences in IL-3 levels measured on days 3 and 7 between survivors and non-survivors. In conclusion, serum IL-3 levels of septic patients measured in the early phases of sepsis correlates with prognosis. Higher levels of this cytokine was shown independently associated with hospital mortality in this population, even after adjusting for variables such as age, APACHE II and SOFA.

Key words: Sepsis, biomarker, interleukin-3, prognosis, intensive care

Introdução

Sepse representa grande problema de saúde pública em todo o mundo, estando presente em aproximadamente 30% dos pacientes internados em terapia intensiva¹. Apesar dos avanços terapêuticos observados nos últimos anos, as taxas de mortalidade por sepse permanecem elevadas, podendo chegar a 50% nos casos mais graves^{1, 2}. Dentre os sobreviventes, os altos índices de readmissão hospitalar³ e o declínio funcional no longo prazo aumentam ainda mais o impacto social e econômico desta síndrome⁴.

Múltiplos aspectos da fisiopatologia da sepse e da interação patógeno-hospedeiro ainda não foram compreendidos⁵. O papel das citocinas pró-inflamatórias e da resposta inflamatória exacerbada na ocorrência de lesão tecidual, disfunção orgânica e morte tem sido bem estabelecido nos últimos anos^{5,6,7}. Contudo, os ensaios clínicos conduzidos para avaliar terapias anti-inflamatórias em pacientes sépticos apresentaram resultados predominantemente desfavoráveis⁸.

Desse modo, novas etapas da cascata inflamatória na sepse vêm sendo estudadas. Como exemplo, Weber e cols. demonstraram recentemente o papel da interleucina-3 (IL-3), uma citocina estimuladora de colônias hematopoiéticas multilinhagem, na mielopoiese emergencial após indução de sepse em modelo animal⁹. De acordo com os resultados experimentais, esta citocina seria responsável pela mobilização e proliferação de células mieloides no contexto da sepse, notadamente neutrófilos e monócitos inflamatórios, desencadeando a liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, inflamação sistêmica, disfunção orgânica e morte. Neste mesmo estudo os autores encontraram associação entre níveis elevados de IL-3 e mortalidade em duas coortes de pacientes sépticos.

O objetivo deste estudo foi avaliar o papel prognóstico da IL-3 em uma coorte de pacientes criticamente enfermos com sepse, correlacionando seus níveis circulantes com desfechos clínicos relevantes, incluindo mortalidade, ocorrência de choque séptico e disfunções orgânicas agudas. Adicionalmente, os níveis séricos de IL-3 foram correlacionados com os níveis de citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17.

Métodos

Delineamento e local do estudo

Trata-se de uma coorte ambispectiva (ambi-directional cohort study) de pacientes sépticos conduzida em uma Unidade de Terapia Intensiva mista de 18 leitos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. Trata-se de hospital de ensino com 547 leitos, referência regional para atendimentos de moderada a alta complexidade. Os dados foram prospectivamente coletados sob a coordenação dos pesquisadores envolvidos no estudo: fase retrospectiva (outubro 2012 – maio 2014) e fase prospectiva (outubro 2014 – janeiro 2016).

População do estudo

Uma vez que este estudo precedeu a publicação das novas definições propostas pelo Consenso Sepse³¹⁰, nele foram adotadas as definições de sepse publicadas em 1992 e revistas em 2002^{11,12}. Desse modo, todo paciente adulto (≥ 18 anos) admitido com diagnóstico suspeito ou confirmado de sepse grave ou choque séptico diagnosticado há menos de 48 horas foi considerado para potencial inclusão. Os critérios de exclusão foram: 1) uso de antibioticoterapia potencialmente eficaz contra o processo infeccioso atual por mais de 48 horas; 2) pacientes sob cuidados paliativos; 3) pacientes com expectativa de óbito para as próximas 24 horas ou que faleceram neste período; 4) pacientes imunossuprimidos graves (infecção pelo HIV com linfócitos CD4+ < 200/mm³; neutropenia grave < 500/mL; pós-transplante de órgão sólido ou medula óssea em terapia imunossupressora; pacientes em uso de corticoterapia em dose de prednisona ou equivalente superior a 10mg/dia por ≥ 30 dias ou 40mg/dia por ≥ 10 dias; pacientes em uso de quimioterápicos nos últimos 28 dias); 5) pacientes vítimas de politrauma ou submetidos à cirurgia de grande porte nos últimos cinco dias (exceto se cirurgia para controle de foco infeccioso). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais e toda inclusão ocorreu mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo paciente ou responsável.

Procedimentos

Os pacientes foram avaliados para potencial inclusão no momento da sua admissão na UTI sede do estudo ou imediatamente após diagnóstico de sepse, caso já se encontrassem internados na unidade quando da suspeita de sepse. Os dados clínicos foram coletados prospectivamente através de formulário padronizado e armazenados em banco de dados construído na plataforma Epidata versão 3.1. Foram coletadas as seguintes variáveis: idade e sexo; presença de comorbidades; tipo e foco de infecção; dados microbiológicos com tipo de micro-organismo e perfil de susceptibilidade; nível sérico de lactato arterial e de proteína C reativa (PCR), além de níveis de creatinina, uréia, hemoglobina, hematócrito, plaquetas, leucócitos, bilirrubina, pH arterial, tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (PTTa); os escores de gravidade Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE II)¹³ e o Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)^{14,15} sequencial; duração e classe da terapia antibiótica; ocorrência de disfunções orgânicas tais como disfunção cardiovascular, renal e respiratória e uso de terapias substitutivas (aminas vasoativas, inotrópicos, terapia dialítica e assistência ventilatória mecânica invasiva ou não invasiva); tempo de internação hospitalar e em terapia intensiva; mortalidade por qualquer causa medida na Unidade de Terapia Intensiva, no hospital e aos 28 dias após inclusão no estudo. As comorbidades avaliadas foram: insuficiência cardíaca sistólica ou em classe funcional NYHA \geq II¹⁶; doença pulmonar obstrutiva crônica confirmada; cirrose hepática; insuficiência renal crônica dialítica e não dialítica (clearance de creatinina calculado $<$ 60ml/min); hipertensão arterial sistêmica; diabetes mellitus; infecção pelo HIV; neoplasia sólida ou hematológica.

Desfechos avaliados

Os níveis circulantes de IL-3 foram avaliados em relação à mortalidade hospitalar (desfecho primário) e à aos seguintes desfechos secundários: mortalidade em 28 dias, mortalidade em terapia intensiva; ocorrência de choque séptico (necessidade de terapia vasopressora ou lactato $>$ 4 mmol/L após ressuscitação volêmica adequada), ocorrência de disfunções orgânicas agudas; duração de internação em terapia intensiva e hospitalar.

Cálculo do tamanho amostral

Há apenas um estudo publicado na literatura acerca do uso da IL-3 como marcador prognóstico na sepse⁹. Nesse trabalho, em que a maior parte dos dados foi obtida em modelos experimentais, a avaliação dos níveis de IL-3 em 97 pacientes (dados retrospectivos de uma coorte prospectiva previamente publicada com 60 pacientes e dados prospectivos de uma nova coorte com 37 pacientes) revelou que a IL-3 associa-se à mortalidade mensurada ao 28º dia de seguimento em pacientes portadores de sepse grave ou choque séptico. Considerando-se o valor de corte de 89,4 pg/ml, 38% dos pacientes que faleceram apresentavam IL-3 acima desses níveis, comparados com 11% dos pacientes que sobreviveram, com odds ratio de 4,9 na curva de sobrevivência (Kaplan Meier). A mortalidade global aos 28 dias neste estudo foi de 37,1%. Em uma primeira fase de nossa coorte, a mortalidade aos 28 dias foi de 27,8%. Considerando-se a frequência de IL-3 positivo (> 89,4 pg/ml) em sobreviventes e em pacientes que faleceram até o 28º dia no estudo citado e a razão de alocação de 0,38 desses dois subgrupos de pacientes em nossa coorte retrospectiva (i.e, 1 óbito para cada 2,6 sobreviventes), seriam necessários 95 sobreviventes e 36 óbitos ao 28º dia para que encontrássemos diferença estatística entre os dois grupos. Como o desfecho primário analisado em nosso estudo foi mortalidade hospitalar, ajustou-se o cálculo considerando a taxa de mortalidade hospitalar de 32,9% em uma primeira fase de nossa coorte. Assim, seriam necessários 40 óbitos e 81 sobreviventes a internação hospitalar (total de 121 pacientes) para detectarmos diferença estatística entre esses dois subgrupos com poder de 95% e erro alfa de 5%.

Testes laboratoriais

Amostras de sangue foram obtidas no momento da inclusão (dia 1) e no terceiro (dia 3) e sétimo dia (dia 7) de seguimento. As amostras foram centrifugadas para obtenção do soro, e este então armazenado em alíquotas de 0,5ml em freezer – 80 °C até o momento das análises. A dosagem de IL-3 sérica foi realizada em bloco, através da metodologia de ELISA utilizando-se o Human IL-3 DuoSet Elisa kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), de acordo com instruções do fabricante. Foi também traçado o perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias dos pacientes no momento da inclusão. As dosagens das citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17 foram realizadas pelo método de CBA, conforme instruções do fabricante (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Utilizaram-se

os kits para quantificação de proteínas inflamatórias Human Th1/Th2/Th17 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17).

Análise estatística

Variáveis categóricas são apresentadas de acordo com sua frequência absoluta e relativa. Média e desvio padrão foram utilizados para apresentação de variáveis contínuas de distribuição normal; e mediana e intervalo interquartil para variáveis contínuas de distribuição não normal. Comparações entre variáveis categóricas foram feitas através do teste de chi-quadrado ou teste exato de Fisher. Variáveis contínuas foram comparadas pelos testes t Student ou Mann-Whitney U, de acordo com tipo de distribuição. Correlações entre variáveis contínuas foram feitas utilizando-se o teste de correlação de Spearman. Curvas ROC foram construídas para estabelecer a acurácia das moléculas estudadas em predizer os desfechos analisados. Fatores prognósticos influenciando os desfechos em estudo foram inicialmente avaliados em modelos de análise univariada e aqueles com um valor P menor que 10%, foram avaliados através de análise multivariada. Foram empregados modelos de regressão logística para os desfechos categóricos, regressão linear para as variáveis contínuas e análise dos riscos proporcionais de Cox para as variáveis dependentes de tempo, ajustadas para variáveis potencialmente explicativas dos desfechos analisados. Modelos de predição foram comparados através de medidas de desempenho, sendo elas análise de concordância, estatística R^2 e medida AIC (Akaike Information Criteria).

Teste bicaudal e valor de significância de p de 0,05 foram definidos para todas as análises. Os dados foram analisados utilizando-se os pacotes estatísticos SPSS versão 20.1 (SPSS, Chicago, IL) e R versão 3.1.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

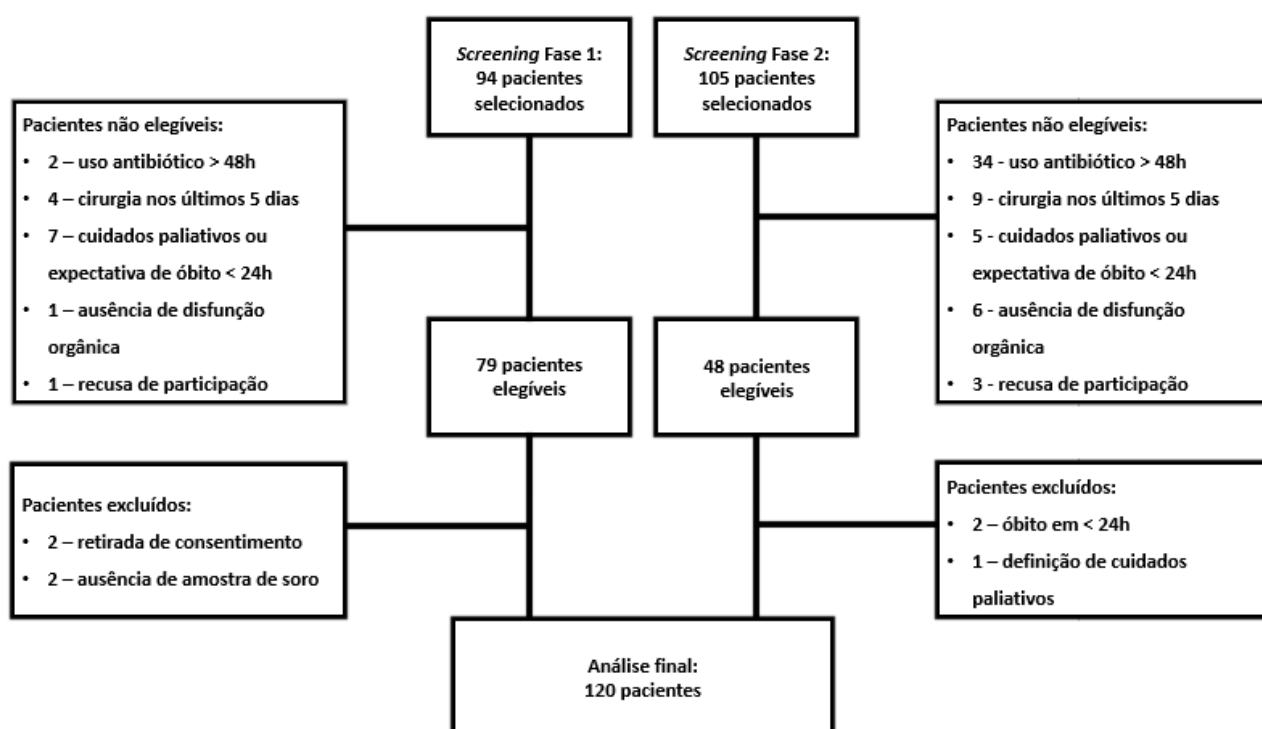
Resultados

Características dos pacientes

Ao todo, 199 pacientes foram triados para avaliação de potencial elegibilidade, sendo 94 na primeira fase (coorte retrospectiva) e 105 na segunda fase (coorte prospectiva). Pacientes que apresentavam critérios de exclusão por imunossupressão não chegaram a ser considerados no *screening* inicial. Desse total, 127 (63,8%) pacientes foram

considerados elegíveis, dos quais sete foram excluídos pelas seguintes razões: retirada de consentimento de participação (2 casos), óbito em menos de 24 horas após inclusão (2 casos), ausência de amostra de soro armazenada (2 casos) e limitação de esforço terapêutico (1 caso). Assim, 120 pacientes foram incluídos na análise final (Figura 4).

Figura 4 – Fluxograma de inclusões



As principais características dos pacientes à inclusão no estudo estão descritas na Tabela 1. Considerando-se o total de pacientes analisados, a mortalidade observada aos 28 dias, na UTI e no hospital foi de 24%, 22,5% e 34%, respectivamente. A idade média da população geral foi de 55 anos (± 18 SD), sendo mais elevada entre os pacientes que faleceram. Houve predominância do sexo masculino (57%). As comorbidades mais frequentes foram hipertensão arterial, diabetes mellitus e neoplasia sólida. Dentre as comorbidades analisadas, apenas a presença de doença renal crônica não dialítica correlacionou-se significativamente com a ocorrência do desfecho primário analisado. Valores do escore APACHE II e SOFA à inclusão foram

significativamente mais altos em pacientes que faleceram em relação que sobreviveram durante a internação hospitalar (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Características dos pacientes à inclusão de acordo com mortalidade hospitalar

Características	Total (n = 120)	Sobreviventes (n = 79)	Óbitos (n = 41)	P
Idade, anos (média ± DP)	55 ± 18	51 ± 17	64 ± 14	< 0,001
Sexo, n (%)				0,1
Masculino	68 (57%)	41 (52%)	27 (66%)	
Feminino	52 (43%)	38 (48%)	14 (34%)	
Comorbidades, n (%)				
Insuficiência cardíaca	16 (13%)	8 (10%)	8 (20%)	0,14
Neoplasia sólida	26 (22%)	15 (20%)	11 (27%)	0,37
Neoplasia hematológica	2 (1,7%)	2 (2%)	0 (0%)	0,30
DPOC	5 (4%)	5 (7%)	0 (0%)	0,09
Cirrose	6 (5%)	3 (4%)	3 (8%)	0,39
Doença renal crônica	11 (9%)	4 (5%)	7 (18%)	0,027
Doença renal crônica dialítica	5 (4%)	4 (5%)	1 (2%)	0,49
Hipertensão arterial	51 (42%)	29 (38%)	22 (56%)	0,06
Diabetes Mellitus	24 (20%)	13 (17%)	11 (27%)	0,18
Tipo de admissão				0,29
Clínica	89 (74%)	61 (77%)	28 (68%)	
Cirúrgica	31 (26%)	18 (23%)	13 (32%)	
APACHE II (mediana, Q1-Q3)	17,5 (12 – 22)	15 (12 - 19)	21 (17 - 27)	< 0,001
SOFA (mediana, Q1-Q3)	8 (6 - 11)	7 (5 - 9)	10 (8 - 13)	< 0,001

DPOC, doença pulmonar obstrutiva crônica, chronic obstructive pulmonary disease; APACHE II, Acute Physiology and Chronic Health disease Classification System II; SOFA, sequential organ failure assessment.

Episódios de sepse e prognóstico

Dados referentes às características dos episódios de sepse e sua evolução estão descritos na tabela 2. Casos de choque séptico foram mais frequentes em relação a sepse grave (83% vs. 17%). Setenta e cinco (63%) pacientes obtiveram confirmação microbiológica da sepse, sendo 51 (42,5%) através de hemoculturas. Do total de casos estudados, 88 (73%) pacientes apresentaram infecção adquirida no hospital, e os sítios mais frequentes de infecção foram pulmonar (33%) e abdominal (24%). A duração média de internação em terapia intensiva foi de 12 (Q1-Q3: 4-21) dias, e de 37 (Q1-Q3: 21-630) dias para internação hospitalar. Ocorrência de choque séptico, necessidade de ventilação mecânica, de terapia de substituição renal e de uso de inotrópicos correlacionaram-se significativamente com a óbito durante a internação hospitalar. Dentre os biomarcadores avaliados na rotina clínica, níveis de lactato e de PCR à inclusão também se correlacionaram significativamente com mortalidade hospitalar (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Características dos episódios de sepse e níveis de biomarcadores em sobreviventes e óbitos durante internação hospitalar

Características	Total (n = 120)	Sobreviventes (n = 79)	Óbitos (n = 41)	P
Tipo de infecção, n (%)				0,97
Comunitária	32 (27%)	21 (27%)	11 (27%)	
Nosocomial	88 (73%)	58 (73%)	30 (73%)	
Confirmação microbiológica, n (%)	75 (63%)	47 (60%)	28 (68%)	0,34
Hemocultura positiva, n (%)	51 (42,5%)	32 (40,5)	19 (46%)	0,54
Documentação microbiológica, n (%)				0,20
Bactéria Gram-positiva	19 (16%)	11 (14%)	8 (19,5%)	
Bactéria Gram-negativa	45 (37,5%)	31 (39%)	14 (34%)	
Sítio de Infecção, n (%)				0,45
Pulmonar – 40 (33%)		20 (25,3%)	14 (34,1%)	
Abdominal – 29 (24%)		20 (25,3%)	9 (22%)	
Urinar – 9 (7%)		6 (7,6%)	3 (7,3%)	
Cateter – 13 (11%)		10 (12,7%)	3 (7,3%)	
Pele e partes moles – 10 (8%)		5 (6,3%)	5 (12,2%)	
Sistema nervoso central – 1 (1%)		0 (0%)	1 (2,4%)	
Outros – 18 (15%)		12 (15,2%)	6 (14,7%)	
Gravidade da sepse, n (%)				0,01
Sepse grave	20 (17%)	18 (23%)	2 (5%)	
Choque séptico	100 (83%)	61 (77%)	39 (95%)	
Tempo internação em UTI, dias (mediana, Q1-Q3)	12 (4 – 21)	10 (4 – 18)	17 (8 – 28)	0,033
Tempo internação hospitalar, dias (mediana, Q1-Q3)	37 (21 – 63)	46 (26 – 73)	34 (21 – 52)	0,075
Necessidade de ventilação mecânica, n (%)	91 (76%)	51 (65%)	40 (98%)	< 0,001
Necessidade de terapia dialítica, n (%)	34 (29%)	12 (15%)	22 (54%)	< 0,001
Uso de inotrópicos primeiras 72h, n (%)	22 (18,3%)	10 (12,7%)	12 (29,3%)	0,026
Uso de corticoides primeiras 72h, n (%)	39 (32,5%)	21 (26,6%)	18 (43,9%)	0,055
Leucócitos D1 g/L (mediana, Q1-Q3)	15,6 (10 – 21)	15,6 (9,7 – 21)	17,8 (10,8 – 21)	0,61
Lactato D1 mg/dL (mediana, Q1-Q3)	2 (1,2 – 3)	1,7 (1,2 – 2,8)	2,55 (1,7 – 3,5)	0,006
PCR D1 mg/L (mediana, Q1-Q3)	237 (177 – 338)	220 (166 – 323)	256 (208 – 357)	0,042
Ureia D1 mg/dl (mediana, Q1-Q3)	65 (35 – 89)	48 (30 – 80)	87 (56 – 118)	< 0,001
RNI D1 (mediana, Q1-Q3)	1,3 (1,1 – 1,6)	1,27 (1,1 – 1,5)	1,41 (1,2 – 2)	0,006

UTI, Unidade de terapia intensiva; D1, dia 1; D3, dia 3; D7, dia 7; PCR, Proteína C reativa; RNI, razão normalizada internacional.

IL-3 e desfecho primário

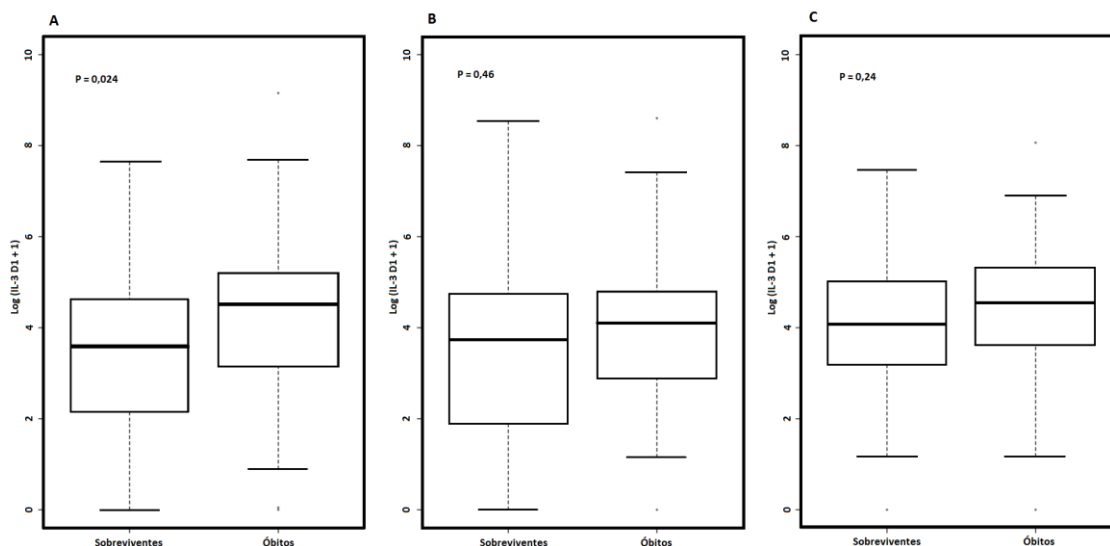
Os níveis séricos de IL-3 foram dosados no momento da inclusão (dia 1) em amostras de soro dos 120 pacientes incluídos no estudo, no dia 3 em 110 (92%) pacientes e no dia 7 de seguimento em 103 (86%) pacientes. Os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN e IL-17 foram dosados somente à inclusão (**Tabela 3**). Os níveis séricos de IL-3 mensurados à inclusão mostraram-se significativamente mais elevados entre os pacientes que faleceram quando comparados aos pacientes que sobreviveram à internação hospitalar, com valores 91,2 (21,7 – 182,6) pg/ml vs 36 (7,0 – 101,8) pg/ml, $p=0,024$, como demonstrado na tabela 3 e na figura 5. Mortalidade hospitalar não se mostrou associada aos níveis de IL-3 mensurados nos dias 3 e 7. Os níveis das citocinas IL-6 e IL-10 mensurados no dia 1 também se mostraram associadas ao prognóstico da sepse, estando mais elevados no grupo de pacientes que faleceram durante a internação hospitalar.

Tabela 3 – Níveis séricos de citocinas em pacientes sépticos que sobreviveram e que faleceram durante internação hospitalar

Citocinas	Total (n = 120)	Sobreviventes (n = 79)	Óbitos (n = 41)	P
IL-3 D1 pg/ml (mediana, Q1-Q3)	48,3 (11,8 – 127,4)	36 (7 – 101,8)	91,2 (21,7 – 182,6)	0,024
IL-3 D3 pg/ml (mediana, Q1-Q3)	45,6 (10,5 – 114,7)	41,2 (9 – 113,7)	59,4 (14,6 – 127)	0,46
IL-3 D7 pg/ml (mediana, Q1-Q3)	62,4 (23,2 – 167)	58,2 (16,4 – 162)	95 (37,2 – 201,7)	0,24
IL-2 D1 pg/ml (mediana, Q1-Q3)	9,4 (8,2 – 11,2)	9,43 (8,4 – 11,3)	9,7 (8,1 – 11,1)	0,97
IL-4 D1 pg/ml (mediana, Q1-Q3)	2,9 (2,5 – 3,3)	2,93 (2,4 – 3,3)	3 (2,5 – 3,3)	0,98
IL-6 D1 pg/ml (mediana, Q1-Q3)	525,4 (118,5 – 5101,8)	402 (57,2 – 2704,5)	2083 (359 – 18608)	0,001
IL-10 D1 pg/ml (mediana, Q1-Q3)	4,9 (2,9 – 10,9)	4,4 (2,7 – 8,3)	6,6 (3,7 – 31,2)	0,008
TNF D1 pg/ml (mediana, Q1-Q3)	3,8 (3 – 4,6)	3,74 (3 – 4,5)	4,1 (3,3 – 4,7)	0,14
INF D1 pg/ml (mediana, Q1-Q3)	4,7 (3,9 – 6,1)	4,9 (4 – 6,4)	4,7 (3,8 – 5,9)	0,45
IL-17 D1 pg/ml (mediana, Q1-Q3)	11,6 (7,7 – 16,8)	11,6 (7,7 – 15,4)	10,5 (7,7 – 20,9)	0,76

IL-3, interleucina-3; D1, dia 1; D3, dia 3; D7, dia 7; IL-2, interleucina-2; IL-4, interleucina-4; IL-6, interleucina-6; IL-10, interleucina-10; TNF, fator de necrose tumoral; INF, interferon gama; IL-17, interleucina-17.

Figura 5 – Níveis circulantes de IL-3 nos dias 1, 3 e 7 de acordo com sobrevida hospitalar– Box plot



Box plots com medianas dos níveis de interleucina 3 (IL-3), intervalos interquartílicos e percentis 10 e 90 nos dias 1 (A), 3 (B), e 7 (C). Níveis de IL-3 expressos em logaritmo.

De acordo com análise em curva ROC, valores iniciais de IL-3 acima de 127,5 pg/ml foram associados à mortalidade hospitalar, com odds ratio de 2,97 (IC95%: 1,27-6,97; $p = 0,019$), especificidade de 82%, sensibilidade 39%, valor preditivo negativo de 72% e *likelihood ratio* negativa de 0,73. Adicionalmente, níveis de IL-3 acima deste valor de corte mantiveram-se independentemente associados à mortalidade hospitalar em análise multivariada ($p = 0,01$) ajustada para o escore APACHE II e PCR (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Mortalidade hospitalar ajustada para as co-variáveis APACHE II e PCR – Regressão logística

Variável	Odds ratio	I.C. 95%	P
APACHE II Cat	3,969	1,671 – 9,425	0,002
IL-3 D1 Cat	3,445	1,346 – 8,820	0,01
PCR	0,997	0,994 – 1,001	0,102

APACHE II Cat, Variável APACHE II categorizada em dois grupos: valores acima e abaixo 17 (percentil 50); IL-3 D1 Cat, Variável IL-3 do dia 1 categorizada em dois grupos: valores acima e abaixo 127,5 pg/ml (percentil 75); PCR, Proteína C reativa; I. C. 95%, Intervalo de confiança 95%.

Em modelo de sobrevivência de Cox, usando como variável dependente a mortalidade hospitalar, os valores de IL-3 medidos à inclusão mantiveram-se independentemente associados ao prognóstico, após ajuste para idade do paciente e valores sequenciais de SOFA nos dias 1, 3 e 7 (**Tabela 5**). De acordo com o modelo, cada aumento de 100 unidades nos níveis de IL-3 à inclusão associa-se a 3,2% de aumento no risco de morte durante a internação.

Tabela 5– Mortalidade hospitalar ajustada para as co-variáveis idade e SOFA sequencial – Análise de sobrevida de Cox

Variável	Hazard ratio	I. C. 95%	P
IL-3 D1	1,032	1,010 – 1,055	0,005
SOFA D1, D3, D7	1,154	1,068 – 1,248	< 0,001
Idade	1,035	1,010 – 1,060	0,005

IL-3, Interleucina-3; D1, Dia 1; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; D3, dia 3; D7, dia 7; I. C. 95%, Intervalo de confiança 95%.

Por fim, com intuito de confirmar se a utilização da IL-3 poderia acrescentar informação prognóstica dada pelo escore SOFA, foram realizadas medidas de desempenho de modelos de predição de mortalidade hospitalar construídos com e sem valores de IL-3. Para tal, empregaram-se os critérios de concordância, estatística R² e AIC (Critério de Informação de Akaike). Comparando-se o modelo construído com valores sequenciais de SOFA e idade com o modelo que utilizava essas mesmas variáveis somadas a valores de IL-3 no dia 1, os três critérios aplicados concordaram em escolher o modelo com IL-3 como superior (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Medidas de performance de modelos – Predição de mortalidade hospitalar

Modelo	Concordância	R² (melhor possível)	AIC
IL-3 D1+ SOFA + Idade	0,777	0,063 (0,486)	234,20
SOFA + Idade	0,743	0,052 (0,483)	236,52

IL-3, Interleucina-3; D1, Dia 1; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; AIC, Critério de Informação de Akaike.

IL-3 e desfechos secundários

Não foram encontradas associações entre níveis de IL-3 à inclusão e ocorrência de choque séptico e disfunções orgânicas específicas, ou com mortalidade em terapia intensiva e aos 28 dias. Os níveis séricos de IL-3 medidos nos dias 1, 3 ou 7 não se mostraram associados a hemocultura positiva ($p = 0,805$) ou com a coloração de Gram das bactérias isoladas, considerando-se apenas o subgrupo de pacientes com confirmação microbiológica da sepse ($p = 0,121$). Vale destacar que entre os pacientes com hemocultura positiva ($n=51$), os níveis de IL-3 obtidos à inclusão mostraram-se significativamente mais elevados entre os pacientes que faleceram, tanto durante a estadia na UTI ($p = 0,007$) quanto durante a internação hospitalar ($p = 0,024$).

IL-3, biomarcadores e escores clínicos

Em análise de correlação, uma correlação negativa significativa, mas fraca, foi encontrada entre níveis de IL-3 no D3 e contagem de neutrófilos à inclusão, com $r = -0,385$, $p = 0,012$. Algumas correlações significativas, também fracas, foram encontradas entre níveis de IL-3 nos três tempos e demais citocinas dosadas no dia 1. Também não foram encontradas correlações entre níveis de IL-3 e duração de internação hospitalar ou em terapia intensiva (**Tabela 7**). Níveis de IL-6 e IL-10 à inclusão apresentaram entre si correlação fortemente positiva e estatisticamente significativa, com $r = 0,772$, $p < 0,001$. Tais citocinas também se correlacionaram positivamente com o escore SOFA à inclusão, com $r = 0,359$ ($p < 0,001$) e $0,375$ ($p < 0,001$), respectivamente.

Tabela 7 – Valor P das análises de correlação entre IL-3 nos três tempos e demais variáveis contínuas avaliadas

Variável	Leucócito	Neutrófilo	PCR	IL-6	TNF	IL-10	IL-17	IL-2	IL-4	IFN	SOFA	APACHE II	Tempo internação hospitalar	Tempo internação UTI
IL-3 D1	0,549	0,099	0,477	0,727	0,085	0,428	0,102	0,003	0,001	0,333	0,040	0,682	0,883	0,072
IL-3 D3	0,093	0,012	0,617	0,777	0,011	0,296	0,163	0,169	0,465	0,287	0,344	0,751	0,056	0,258
IL-3 D7	0,509	0,053	0,708	0,172	0,077	0,099	0,652	0,008	0,001	0,051	0,022	0,102	0,944	0,537

IL-3, interleucina-3; D1, dia 1; D3, dia 3; D7, dia 7; PCR, proteína C reativa; IL-2, interleucina-2 D1; IL-4, interleucina-4 D1; IL-6, interleucina-6 D1; IL-10, interleucina-10 D1; TNF, fator de necrose tumoral D1; INF, interferon gama D1; IL-17, interleucina-17 D1; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; APACHE II, Acute Physiology and Chronic Health disease Classification System II; UTI, Unidade de terapia intensiva.

Discussão

Neste estudo a concentração sérica de IL-3 associou-se de forma independente ao prognóstico de pacientes sépticos internados em terapia intensiva. Níveis mais elevados desta interleucina mensurados à inclusão foram independentemente associados a maior risco de morte durante internação hospitalar.

Valores de IL-3 acima de um ponto de corte estabelecido neste estudo mostraram-se preditores de pior prognóstico nos pacientes estudados, o que se manteve a despeito do ajuste para escores de gravidade e para outros marcadores inflamatórios (ie, PCR). A associação independente da IL-3 com a mortalidade foi observada em dois modelos multivariados distintos, o que torna o achado mais consistente. A estratégia de se buscar valores de corte de biomarcadores para auxiliar na predição prognóstica tem sido investigada com outras moléculas, notadamente PCR e procalcitonina (PCT). Estudo multicêntrico realizado em 31 UTIs belgas revelou que valores de PCR à admissão acima de 100mg/L se relacionaram independentemente à ocorrência de disfunção respiratória, renal e de coagulopatia, e também à mortalidade hospitalar em uma população mista de pacientes críticos, em comparação com pacientes que apresentavam valores de PCR à admissão < 10mg/L¹⁷. Já em pacientes internados com pneumonia adquirida na comunidade (PAC), estudo com 570 pacientes demonstrou que valores de PCR < 100 mg/L à admissão estavam associados à menor taxa de mortalidade aos 30 dias¹⁸. Com relação à PCT, Jensen e cols. demonstraram em uma população de pacientes criticamente enfermos, que valores acima de 1 ng/mL desse

marcador foram preditores independentes de morte aos 90 dias em análise multivariada¹⁹. A determinação de valores de corte de biomarcadores no manejo de pacientes críticos infectados vem se mostrando útil especialmente no auxílio à tomada de decisões acerca de suspensão precoce e tempo total de uso de antimicrobianos^{20,21}. A utilidade do uso rotineiro de biomarcadores como alerta para a necessidade de se ampliar intervenções terapêuticas ou propedêuticas em pacientes críticos com sepse ainda não se mostrou custo-efetiva²², e a condução de estudos de intervenção que avaliem experimentalmente esta questão se faz necessária.

Inúmeros dados disponíveis na literatura vão de encontro à teoria da terapia anti-inflamatória na sepse²³. Neste sentido alguns estudos avaliaram o benefício na utilização de fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) no tratamento de pacientes sépticos, que apesar de ter se mostrado seguro, ainda não possui eficácia definida²⁴. Devemos considerar então que a abordagem individualizada com a caracterização do status imunológico e inflamatório do paciente através de dados clínicos e painéis de biomarcadores e citocinas pode ser o caminho para resposta a esta questão. Neste cenário a dosagem de IL-3, feita através de uma técnica bem simples e reprodutível poderia auxiliar na identificação de um subgrupo de pacientes de pior prognóstico e que seriam eventuais candidatos à determinadas terapias. Como exemplo, inúmeros ensaios clínicos e metanálises indicaram recentemente um potencial benefício da utilização de baixas doses de corticoides por curto período em pacientes internados por PAC^{25,26}. Entretanto evidências sugerem que o grupo de pacientes com PAC grave associada à resposta inflamatória exacerbada apresentaria maior benefício relacionado a tal terapia²⁷, tornando imperativa a seleção dos mesmos através de biomarcadores inflamatórios objetivos.

Apesar da sua associação com o prognóstico da sepse, a performance apresentada pela IL-3 neste estudo não se mostrou superior à de outros biomarcadores^{17,19,28,29,30,31} e de escores clínicos^{32,33} previamente estudados. Além disso, o comportamento dos níveis séricos da IL-3 ao longo do curso da sepse mostrou-se errático (dados não apresentados), ao contrário do que ocorre com marcadores inflamatórios como a PCR³⁴ e a procalcitonina^{35,36}, os quais apresentam queda progressiva e mais previsível nos casos de boa resposta ao tratamento antibiótico. Esse comportamento da IL-3

pode ser um fator limitante de sua utilidade para o monitoramento dos pacientes sépticos durante a fase inicial de tratamento.

Não se observou associação entre os níveis de IL-3 e os desfechos secundários avaliados, como mortalidade em terapia intensiva, mortalidade aos 28 dias e ocorrência de choque séptico. Em análise de subgrupo de pacientes com hemocultura positiva, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre sobreviventes e pacientes que faleceram durante internação hospitalar e também em terapia intensiva. Considerando toda a população estudada, níveis de IL-3 à inclusão apresentaram correlação significativa, mas fraca, apenas com o escore SOFA, sem qualquer correlação com o escore APACHE II, outros biomarcadores como PCR e lactato e outras citocinas pró e anti-inflamatórias. A fraca ou ausente sincronia dos níveis de IL-3 com os níveis de biomarcadores classicamente estudados, assim como a fraca correlação dos seus níveis com os valores de escores de gravidade observados neste estudo, demonstram a necessidade de se proceder a maiores investigações acerca do comportamento e da utilidade dessa citocina em pacientes com sepse.

O valor de corte escolhido para a IL-3 neste estudo corresponde ao valor superior do terceiro quartil na amostra, o que privilegiou a especificidade e, por conseguinte, a capacidade de predição negativa do marcador, com uma maior certeza sobre o melhor prognóstico daqueles com níveis de IL-3 inferiores ao valor de corte. Tal estratégia mostra-se importante na prática clínica e pode auxiliar a tomada de decisões terapêuticas, evitando-se o ônus de se tratar de forma mais agressiva e invasiva do que o necessário. No estudo de Weber e cols.⁹, os autores assumiram valores de corte para IL-3 correspondentes ao valor superior do quarto quintil. Assim, foi demonstrado que valores de IL-3 acima de 89,4 pg/ml associaram-se à mortalidade aos 28 dias com uma odds de 4,979 ($p = 0,001$; 95%IC 1,680 – 14,738), independentemente de ajustes para SOFA, APACHE II, SAPS 3 e idade. As diferenças observadas nos resultados obtidos pelos dois estudos podem se justificar por diferenças nas características dos pacientes estudados. Weber e cols. avaliaram uma população de 97 pacientes, oriundos de duas coortes diferentes, uma delas retrospectiva. Os pacientes apresentavam média de idade mais elevada (média $65,8 \pm 13,6$ anos) do que os incluídos no nosso estudo (média 55 ± 18 anos), e os pacientes eram aparentemente mais graves (maiores

valores de escores de gravidade e mortalidade mais elevada) quando comparados aos incluídos em nosso estudo. O papel da IL-3 como marcador prognóstico pode ser mais relevante em pacientes sépticos mais gravemente enfermos. Além disso, as dosagens iniciais de IL-3 no estudo de Weber e cols. foram realizadas em amostras coletadas dentro das primeiras 24 horas de evolução da sepse, janela esta estendida para 48 horas em nosso estudo. Outros fatores que potencialmente justificam as diferenças encontradas entre os dois estudos levam em conta diferenças genéticas entre as populações estudadas³⁷. Diferenças genéticas entre populações humanas são em sua maioria variações encontradas entre indivíduos de um mesmo continente³⁸ e 5% a 8% atribuídas a diferenças inter-continentais³⁹. Inúmeros single nucleotide polymorphism (SNPs) de genes envolvidos na cascata inflamatória em resposta a infecções já foram descritos, notadamente em regiões promotoras dos genes TNF- α , IL-6 e IL-10 e codificadoras do receptor antagonista de IL-1⁴⁰. Considerando os novos achados sobre a participação da IL-3 na fisiopatologia da sepse, parece razoável supor que SNPs do gene responsável pela transcrição desse citocina, já descritos em outros contextos como asma e atopia^{41,42}, esquizofrenia⁴³ e artrite reumatoide⁴⁴, possam justificar diferenças de níveis e comportamento de IL-3 encontradas entre diferentes populações de pacientes sépticos.

Em relação às demais citocinas avaliadas neste estudo, como esperado, os níveis de IL-6 e IL-10 se mostraram significativamente mais elevados em pacientes que faleceram durante internação hospitalar, corroborando dados previamente publicados^{5,29,45,46,47,48}, e sugerindo que tanto a inflamação exacerbada levando a lesão tecidual e disfunção orgânica quanto a imunossupressão desencadeada pela sepse são fatores definidores de mau prognóstico. Por fim, diferentemente do que poderíamos prever considerando dados previamente publicados⁹, em nosso estudo não encontramos qualquer correlação entre a concentração de IL-3 e níveis de leucócitos, neutrófilos ou outras citocinas inflamatórias.

Nosso estudo possui diversas limitações. Trata-se de estudo realizado em um único centro, com uma amostra pequena de pacientes, o que limita o poder das análises estatísticas e a extrapolação de nossos achados para outros cenários. Não houve um grupo controle com dosagem de IL-3 e demais citocinas em voluntários saudáveis ou

em pacientes críticos sem sepse. Entretanto como a mensuração das citocinas já é bem padronizada e o objetivo primário era avaliar o impacto de seus níveis em desfechos clínicos em uma população específica, tal dosagem não era mandatória. Parte da coorte foi retrospectiva, porém os dados foram coletados prospectivamente dentro do mesmo protocolo utilizado na fase prospectiva no estudo. O momento da coleta de amostra de soro, especialmente aquela realizada à inclusão do paciente, também pode ter sido um fator limitante, dada a janela de até 48 horas após o diagnóstico e início de tratamento da sepse para inclusão do paciente no estudo. Dosagens realizadas em soro coletado mais tardiamente, especialmente aquelas após 24 horas do início da antibioticoterapia, podem não refletir de maneira fidedigna os níveis de IL-3 do momento da deflagração da cascata inflamatória, tendo em vista a curta meia vida deste biomarcador⁴⁹.

Conclusão

Neste estudo com 120 pacientes portadores de sepse grave e choque séptico na UTI de um hospital universitário, níveis séricos elevados de IL-3 associaram-se independentemente com a mortalidade hospitalar. Ainda que se mostre promissora, o uso isolado desta citocina não foi superior ao de outros biomarcadores e escores clínicos classicamente utilizados como preditores na sepse. Mais estudos são necessários para confirmar nossos achados da IL-3 como um marcador prognóstico na sepse, idealmente com um número maior de participantes. Por fim, o benefício de se utilizar a IL-3 como parte de um painel de biomarcadores para definição prognóstica e estratificação de risco em pacientes sépticos deve ser avaliada em futuras investigações.

Referências

1. Vincent JL, Marshall JC, Namendys-Silva SA, François B, Martin-Loeches I, Lipman J, Reinhart K, Antonelli M, Pickkers P, Njimi H, Jimenez E, Sakr Y; ICON investigators. Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med*. 2014 May;2(5):380-6.
2. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348:1546-54.
3. Goodwin AJ, Rice DA, Simpson KN, Ford DW. Frequency, cost, and risk factors of readmissions among severe sepsis survivors. *Crit Care Med*. 2015 Apr;43(4):738-46.
4. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA*. 2010 Oct 27;304(16):1787-94.
5. van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis*. 2008 Jan;8(1):32-43.
6. Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta*, Sep 2002, 323 (1-2): 59-72.
7. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med*. 1993 Oct; 119 (8): 771-778.
8. Eichacker PQ, Parent C, Kalil A, et al. Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1197–205.
9. Weber GF, Chousterman BG, He S, Fenn AM, Nairz M, Anzai A *et al*. Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis. *Science*. 2015 Mar 13;347(6227):1260-5.
10. Singer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):801-10.
11. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, *et al*. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992 Jun;101(6):1644-55.
12. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Critical care medicine*. 2003;31(4):1250-6.
13. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*. 1985 Oct;13(10):818-29.
14. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, *et al*. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure: on behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*. 1996;22:707–710.
15. Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Mélot C, Vincent JL. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA*. 2001 Oct 10;286(14):1754-8.
16. The Criteria Committee of the New York Heart Association . Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels. 9th ed Little, Brown & Co; Boston, Mass: 1994. 253–256.

17. Lobo SM, Lobo FR, Bota DP, Lopes-Ferreira F, Soliman HM, Mélot C, Vincent JL. C-reactive protein levels correlate with mortality and organ failure in critically ill patients. *Chest*. 2003 Jun;123(6):2043-9.
18. Chalmers JD, Singanayagam A, Hill AT. C-reactive protein is an independent predictor of severity in community-acquired pneumonia. *Am J Med*. 2008 Mar;121(3):219-25.
19. Jensen JU, Heslet L, Jensen TH; et al. Procalcitonin increase in early identification of critically ill patients at high risk of mortality. *Crit Care Med*. 2006 ; 34:2596-602.
20. Oliveira CF, Botoni FA, Oliveira CR, Silva CB, Pereira HA, Serufo JC, Nobre V. Procalcitonin versus C-reactive protein for guiding antibiotic therapy in sepsis: a randomized trial. *Crit Care Med*. 2013 Oct;41(10):2336-43.
21. Salluh J, Nobre V, Povoia P. Using procalcitonin to guide antimicrobial duration in sepsis: asking the same questions will not bring different answers. *Crit Care*. 2014 May 13;18(3):142.
22. Jensen JU, Hein L, Lundgren B, Bestle MH, Mohr TT, Andersen MH, et al. Procalcitonin And Survival Study (PASS) Group. Procalcitonin-guided interventions against infections to increase early appropriate antibiotics and improve survival in the intensive care unit: a randomized trial. *Crit Care Med*. 2011 Sep;39(9):2048-58.
23. Wenzel RP, Edmond MB. Septic shock: evaluating another failed treatment. *N Engl J Med*. 2012;366:2122–2124.
24. Bo L, Wang F, Zhu J, Li J, Deng X. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) for sepsis: a meta-analysis. *Crit Care*. 2011;15(1):R58.
25. Wan YD, Sun TW, Liu ZQ, Zhang SG, Wang LX, Kan QC. Efficacy and Safety of Corticosteroids for Community-Acquired Pneumonia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Chest*. 2016 Jan;149(1):209-19.
26. Siemieniuk RA, Meade MO, Alonso-Coello P, Briel M, Evaniew N, Prasad M, et al. Corticosteroid Therapy for Patients Hospitalized With Community-Acquired Pneumonia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2015 Oct 6;163(7):519-28.
27. Torres A, Sibila O, Ferrer M, Polverino E, Menendez R, Mensa J, et al. Effect of corticosteroids on treatment failure among hospitalized patients with severe community-acquired pneumonia and high inflammatory response: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2015;313(7):677-86.
28. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care*. 2010;14(1):R15.
29. Pettila V, Hynninen M, Takkunen O, Kuusela P, Valtonen M. Predictive value of procalcitonin and interleukin 6 in critically ill patients with suspected sepsis. *Intensive Care Med*. 2002 Sep; 28 (9): 1220-5.
30. Garnacho-Montero J, Huici-Moreno MJ, Gutiérrez-Pizarra A, López I, Márquez-Vácaro JA, Macher H, Guerrero JM, Puppo-Moreno A. Prognostic and diagnostic value of eosinopenia, C-reactive protein, procalcitonin, and circulating cell-free DNA in critically ill patients admitted with suspicion of sepsis. *Crit Care*. 2014 Jun 5;18(3):R116.
31. Jones AE, Shapiro NI, Trzeciak S, Arnold RC, Claremont HA, Kline JA, et al. Lactate clearance vs central venous oxygen saturation as goals of early sepsis therapy: a randomized clinical trial. *Jama*. 2010;303(8):739-46.
32. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, Rubenfeld G, Kahn JM, Shankar-Hari M, Singer M, Deutschman CS, Escobar GJ, Angus DC. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):762-74.

33. Giamarellos-Bourboulis EJ, Norrby-Teglund A, Mylona V, Savva A, Tsangaris I, Dimopoulou I et al. Risk assessment in sepsis: a new prognostication rule by APACHE II score and serum soluble urokinase plasminogen activator receptor. *Crit Care*. 2012 Aug 8;16(4):R149.
34. Lisboa T, Seligman R, Diaz E, Rodriguez A, Teixeira PJ, Rello J. C-reactive protein correlates with bacterial load and appropriate antibiotic therapy in suspected ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med*. 2008 Jan;36(1):166-71.
35. Seligman R. et al. Decreases in procalcitonin and C-reactive protein are Strong predictors of survival in ventilator-associated pneumonia. *Crit Care*. 2006; 10:R125.
36. Karlsson S, et al. Predictive value of procalcitonin decrease in patients with severe sepsis: a prospective observational study. *Crit Care*. 2010; 14 (6), R205.
37. Texereau J, Pene F, Chiche JD, Rousseau C, Mira JP. Importance of hemostatic gene polymorphisms for susceptibility to and outcome of severe sepsis. *Crit Care Med*. 2004 May;32(5 Suppl):S313-9.
38. Jorde LB, Wooding SP. Genetic variation, classification and 'race'. *Nat Genet*. 2004 Nov;36(11 Suppl):S28-33.
39. Durbin RM, Abecasis GR, Altshuler DL, Auton A, Brooks LD, et al. (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467: 1061–1073.
40. Villar J, Maca-Meyer N, Pérez-Méndez L, Flores C. Bench-to-bedside review: understanding genetic predisposition to sepsis. *Crit Care*. 2004 Jun;8(3):180-9.
41. Jeong MC, Navani A, Oksenberg JR. Limited allelic polymorphism in the human interleukin-3 gene. *Mol Cell Probes*. 1998 Feb;12(1):49-53.
42. Miyake Y, Tanaka K, Arakawa M. IL3 rs40401 polymorphism and interaction with smoking in risk of asthma in Japanese women: the Kyushu Okinawa Maternal and Child Health study. *Scand J Immunol*. 2014 Jun;79(6):410-4.
43. Liu Z, Huang L, Wang D, Wu L. Association of interleukin 3 (IL-3) polymorphisms with schizophrenia in Han Chinese population. *Neurosci Lett*. 2015 Sep 25;605:12-7.
44. Wang MJ, Zhou XD, Zhang H, Liu RP. Correlation between IL-3 and IL-13 gene polymorphisms in Chinese patients and rheumatoid arthritis. *Genet Mol Res*. 2016 May 23;15(2).
45. Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest*. Feb 1993; 103 (2); 565-75.
46. Rose, WT, et al. Elevated serum interleukin-10 at time of hospital admission is predictive of mortality in patients with Staphylococcus bacteremia. *J Infect Dis*. 2012 Nov; 206(10): 1604-11.
47. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro-versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: A marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis*. 2000; 181(1):176–180.
48. Kellum JA, Kong L, Fink MP, Weissfeld LA, Yealy DM, Pinsky MR, et al; GenIMS Investigators. Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. *Arch Intern Med*. 2007 Aug 13-27;167(15):1655-63.
49. Guba SC, Stella G, Turka LA, June CH, Thompson CB, Emerson SG. Regulation of interleukin 3 gene induction in normal human T cells. *J Clin Invest*. 1989 December; 84(6): 1701–1706.

8. CONCLUSÕES

- A concentração sérica de IL-3 dosada no momento da admissão do paciente com sepse grave ou choque séptico em terapia intensiva correlaciona-se com seu prognóstico.
- Níveis mais elevados de IL-3 mostraram-se independentemente associados a mortalidade hospitalar nesta população, mesmo após ajustes para variáveis como idade e os escores APACHE II e SOFA.
- Não foram encontradas associações entre níveis de IL-3 e ocorrência de choque séptico e disfunções orgânicas específicas, ou com mortalidade em terapia intensiva e aos 28 dias.
- Concentrações séricas de IL-6 e IL-10 elevadas associaram-se significativamente a mortalidade hospitalar em pacientes com sepse grave e choque séptico.
- Valores de IL-3 utilizados isoladamente não trazem maiores informações do que outras ferramentas amplamente disponíveis na prática clínica. Associados a outros métodos, acrescentam informação em relação a predição prognóstica, revelando sua potencial utilidade em conjunto a um painel de biomarcadores e demais citocinas na definição do perfil inflamatório e risco do paciente.
- Mais estudos são necessários para confirmar nossos achados da IL-3 como um marcador prognóstico e para testar sua potencial utilização como um alvo terapêutico na sepse.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da grande quantidade de estudos que avaliam a utilidade de biomarcadores na sepse, as altas taxas de morbimortalidade da síndrome levam a uma busca incessante por melhora do cuidado e otimização individualizada do tratamento. Neste cenário, o surgimento de uma molécula com papel fisiopatológico essencial demonstrado experimentalmente e ainda com potencial utilidade quando utilizada como biomarcador nos pareceu uma linha de estudo promissora.

A interleucina-3, uma citocina com papel indutor mieloide já estudada na fisiopatologia de outras doenças como asma e leucemia mieloide aguda (LAI *et al.*, 1996; SADRAS *et al.*, 2014), foi pela primeira vez associada ao processo fisiopatológico da sepse (WEBER *et al.*, 2015). Em contraste a escassa literatura referente ao tema em questão, restrita essencialmente ao estudo de Weber e cols., a potencial originalidade foi um estímulo importante ao desenvolvimento do trabalho.

Em nosso estudo inúmeras análises foram realizadas com o objetivo de definir de forma mais palpável o papel prognóstico da IL-3 na sepse. Os achados mais relevantes, já descritos no corpo do artigo em elaboração para publicação, confirmam a hipótese inicialmente levantada. Nossos achados estão em concordância com dados prévios da literatura de que tanto a inflamação quanto estímulos anti-inflamatórios e supressores imunológicos exacerbados estão relacionados aos altos índices de mortalidade da síndrome séptica (KELLUM *et al.*, 2007).

Algumas análises adicionais estão colocadas nesta sessão, suprimidas do corpo principal do artigo por apresentarem menor rigor estatístico, por serem formas diferentes de apresentação de mesmos resultados ou simplesmente pela ausência de significância estatística.

Os níveis de IL-3 nos dias 3 e 7 não se associaram a ocorrência de qualquer dos desfechos analisados (**Tabela 8, Figuras 6 e 7**). Tais desfechos também não apresentaram qualquer correlação com o

comportamento da IL-3 ao longo do episódio (Δ IL-3 D3 – D1; Δ IL-3 D7 – D1; Δ IL-3 D7 – D3), que se mostrou aleatório e pouco previsível (**Figura 8**).

Tabela 8 – Valor P das análises comparativas (Mann-Whitney U) dos níveis de IL-3 nos dias 1, 3 e 7 de acordo com ocorrência dos desfechos clínicos analisados

Variável	Desfecho	Mortalidade hospitalar	Mortalidade UTI	Mortalidade 28º dia	Choque séptico	Necessidade VM 28º dia	Necessidade HD 28º dia	Uso inotrópicos 72h
IL-3 D1		0,024	0,091	0,255	0,717	0,832	0,904	0,067
IL-3 D3		0,46	0,270	0,896	0,729	0,322	0,978	0,749
IL-3 D7		0,24	0,549	0,401	0,639	0,586	0,409	0,795

IL-3, Interleucina-3; D1, Dia 1; D3, Dia 3; D7, dia 7; UTI, Unidade de Terapia Intensiva; VM, Ventilação mecânica; HD, hemodiálise; 72h, 72 horas.

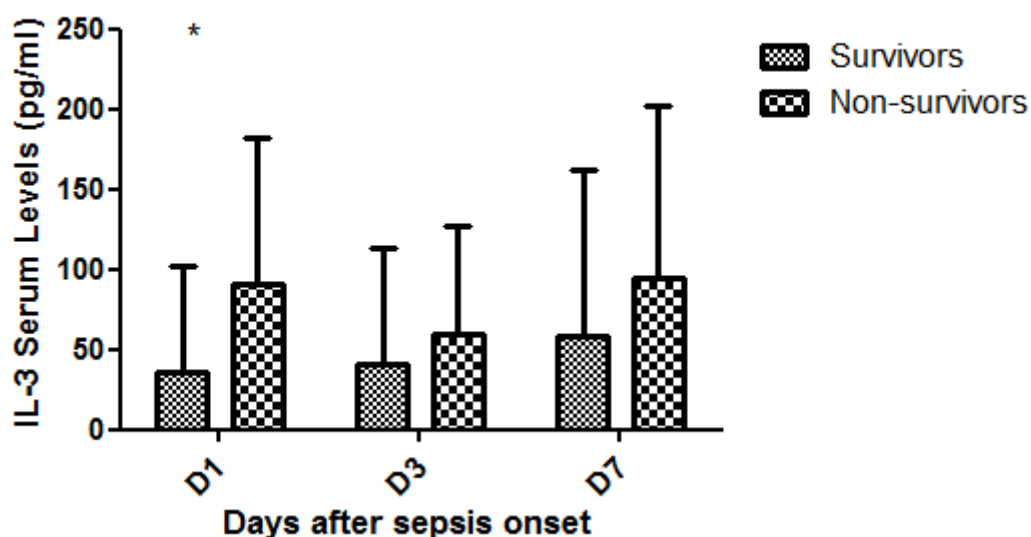


Figura 6 – Gráfico de barra – níveis séricos de IL-3 nos dias 1, 3 e 7 de acordo com sobrevivência hospitalar. Barras intervaladas com mediana dos níveis de interleucina-3 (IL-3) e percentil 75 nos dias 1 (D1), 3 (D3) e 7 (D7). * p estatisticamente significativo.

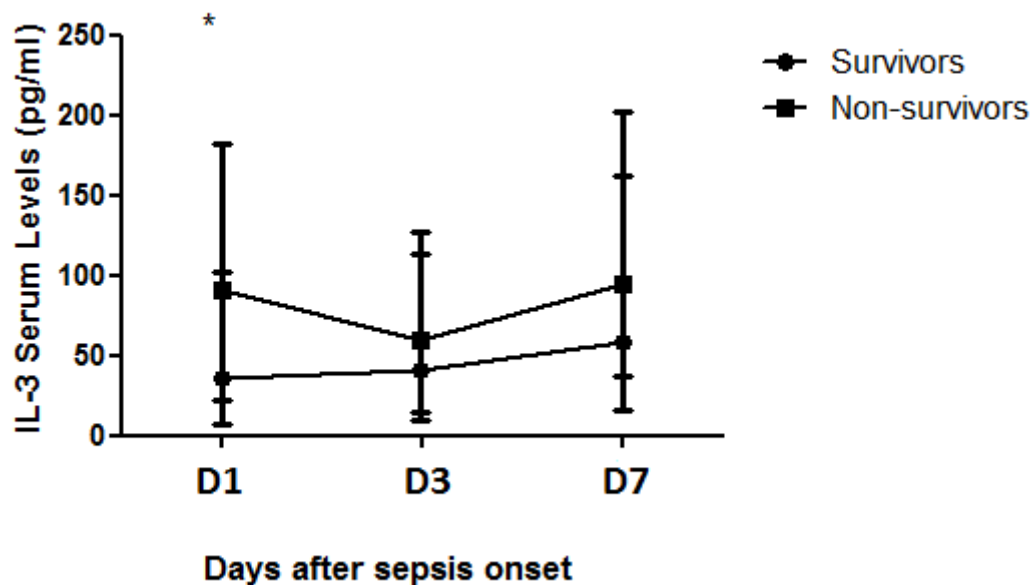


Figura 7 – Gráfico de linha – níveis séricos de IL-3 nos dias 1, 3 e 7 de acordo com sobrevivência hospitalar. Gráfico em linha com mediana dos níveis de interleucina-3 (IL-3) e percentil 25 e 75 nos dias 1 (D1), 3 (D3) e 7 (D7). * p estatisticamente significativo.

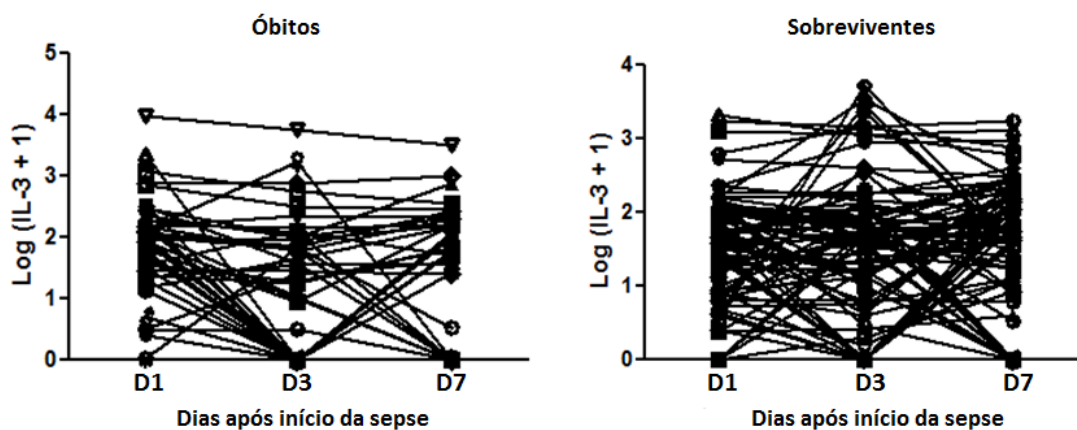
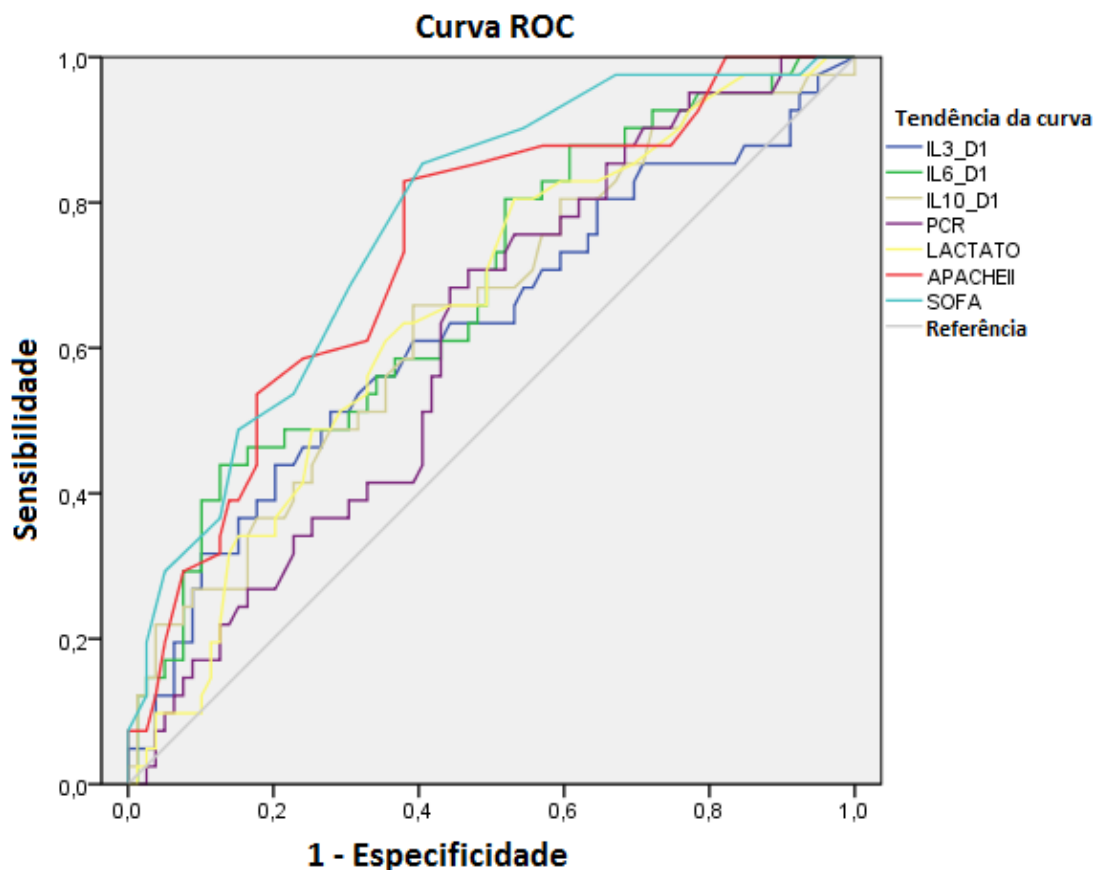


Figura 8 – Comportamento dos níveis de IL-3 durante os primeiros sete dias de sepse em sobreviventes e pacientes que faleceram durante internação hospitalar. IL-3, Interleucina-3; D1, dia 1; D3, dia 3; D7, dia 7. Níveis de IL-3 expressos em logaritmo

Curvas ROC foram construídas para se estabelecer a acurácia de biomarcadores e escores clínicos em prever os desfechos avaliados.

Houve significância estatística na análise da acurácia da IL-3 em prever o desfecho primário mortalidade hospitalar (**Figura 9**), mesmo que com desempenho modesto. Entretanto a metodologia não é a mais adequada para se avaliar ocorrência de desfechos dependentes de tempo, e portanto com exposição a risco variáveis.



	AUC (IC 95%)	Erro padrão	P
IL-3 D1	0,62 (0,51 – 0,73)	0,056	0,024
IL-6 D1	0,68 (0,58 - 0,78)	0,051	0,001
IL-10 D1	0,65 (0,54 – 0,75)	0,053	0,008
PCR	0,61 (0,51 – 0,71)	0,052	0,042
Lactato	0,65 (0,55 – 0,75)	0,051	0,006
APACHE II	0,73 (0,64 – 0,82)	0,048	< 0,001
SOFA	0,77 (0,68 – 0,85)	0,044	< 0,001

Figura 9 – Curva ROC de citocinas, PCR, lactato e escores clínicos para o desfecho mortalidade hospitalar. IL-3, Interleucina-3; IL-6, interleucina-6; IL-10, interleucina-10; PCR, Proteína C reativa; APACHE II, Acute Physiology and Chronic Health disease Classification System II; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; AUC, Área sob a curva.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILAI, S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 7ª edição, 2012.

ABRAHAM, E. Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis. *Intensive Care Medicine*, v. 25, p. 556-65, 1999.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUSHI, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, v. 124, p. 783–801, Feb 2006.

ALBERTI, C., *et al.* Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill infected patients. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 168, n. 1, p. 77-84, Jul 2003.

ALBERTI, C., *et al.* Systemic inflammatory response and progression to severe sepsis in critically ill infected patients. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 171, n. 5, p. 461-8, Mar 2005.

ANDRADE, J. *et al.* Sepsis Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepsis em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. *Rev Bras Ter Intensiva*, v. 18, n. 1, p. 9 – 17, Jan 2006.

ANGUS, D.C. The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board? *JAMA*, v. 306, p. 2614, 2011.

ANGUS, D. C., *et al.* A systematic review and meta-analysis of early goal-directed therapy for septic shock: the ARISE, ProCESS and ProMISe Investigators. *Intensive Care Med*, v. 41, n. 9, p. 1549-60, Sep 2015.

ANGUS, D. C. *et al.* Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, v. 29, p. 1303-10, 2001.

ANGUS, D. C.; VAN DER POLL, T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, v. 369, n. 9, p. 840-51, Aug 2013.

BELL, B. G.; SCHELLEVIS, F.; STOBBERINGH, E.; GOOSSENS, H.; PRINGLE, M. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infectious Diseases*, v. 14, n. 13, Jan 2014.

BONE, R.C. *et al.* American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*, v. 20, n. 6, p. 864-74, 1992.

BONE, R. C.; GRODZIN, C. J.; BALK, R. A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *CHEST*, v. 112, p. 235-43, 1997.

BOUADMA, L. *at al.* Use of procalcitonin to reduce patients' exposure to antibiotics in intensive care units (PRORATA trial): a multicentre randomised controlled trial. *The Lancet*, v. 375, p. 463-74, 2010.

CASEY, L. C.; BALK, R. A.; BONE, R. C. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med*, v. 119, n. 8, p. 771-8, Oct 1993.

CHALMERS, J. D.; SINGANAYAGAM, A.; HILL, A.T. C-reactive protein is an independent predictor of severity in community-acquired pneumonia. *The American Journal of Medicine*, v. 121, n. 3, p. 219-25, 2008.

CHAN, J. K. *et al.* Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Invest*, v. 122, n. 8, p. 2711-19, 2012.

CONDE, K. A., *et al.* Differences in sepsis treatment and outcomes between public and private hospitals in Brazil: a multicenter observational study. *PLoS One*, v. 8, n. 6, e64790, Jun 2013.

DAHABA, A. A.; HAGARA, B.; FALL, A.; *et al.* Procalcitonin for early prediction of survival outcome in postoperative critically ill patients with severe sepsis. *Br J Anaesth*, v. 97, p. 503-8; 2006.

DANAI, P. A.; MOSS, M.; MANNINO, D. M.; MARTIN, G. S. T. The epidemiology of sepsis in patients with malignancy. *Chest*, v. 129, n. 6, p. 1432-40, Jun 2006.

DE JONG, E., *et al.* Efficacy and safety of procalcitonin guidance in reducing the duration of antibiotic treatment in critically ill patients: a randomised, controlled, open-label trial. *Lancet Infect Dis*, v. 16, n. 7, p. 819-27, Jul 2016.

DELLINGER, R. P., *et al.* Surviving Sepsis Campaign guidelines for the management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med*, v. 30, p. 536-555, 2004.

DELLINGER, R. P., *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for the management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Crit Care Med*, v. 41, n. 2, p. 580-637, Feb 2013.

DUPUY, A. M. *et al.* Role of biomarkers in the management of antibiotic therapy: an expert panel review: I - currently available biomarkers for clinical use in acute infections. *Annals of Intensive Care*, v. 3, n. 1, p. 22-29, 2013.

EICHACKER, P. Q., *et al.* Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 166, p. 1197-205, 2002.

ESPER, A. M., *et al.* The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis. *Crit Care Med*, v. 34, n. 10, p. 2576-82, Oct 2006.

FERREIRA, F. L.; BOTA, D. P.; BROSS, A.; MELOT, C.; VINCENT, J. L. Serial Evaluation of the SOFA Score to Predict Outcome in Critically Ill Patients. *JAMA*, v. 286, n. 14, p. 1754-58, Oct 2001.

FLEISCHMANN, C., *et al.* International Forum of Acute Care Trialists. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis: current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015.

FREEMAN, B. D.; NATANSON, C. Anti-inflammatory therapies in sepsis and septic shock. *Expert Opin Investig Drugs*, v. 9, n. 7, p. 1651-53, 2000.

GAIESKI, D. F.; Edwards, J. M.; Kallan, M. J.; Carr, B.G. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med*, v. 41, n. 5, p. 1167-74, 2013.

GARLAND, J. M.; ALDRIDGE, A.; WAGSTAFFE, J.; DEXTER, T. M. Studies on the in vivo production of a lymphokine activity, interleukin 3 (IL-3) elaborated by lymphocytes and a myeloid leukaemic line in vitro and the fate of IL-3 dependent cell lines. *Br J Cancer*, v. 48, n. 2, p. 247-59, Aug 1983.

GENTILE, L. F., *et al.* Persistent inflammation and immunosuppression: A common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *J Trauma Acute Care Surg*, v. 72, n. 6, p. 1491-501, 2012.

GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.; *et al.* Procalcitonin: a marker to clearly differentiate systemic inflammatory response syndrome and sepsis in the critically ill patient? *Intensive Care Med*, v. 28, n. 9, p. 1351-6, Sep 2002.

GINDE, A. A., *et al.* Age-related differences in biomarkers of acute inflammation during hospitalization for sepsis. *Shock*, v. 42, n. 2, p. 99-107, Aug 2014.

GOLDENBERG, N. M.; STEINBERG, B. E.; SLUTSKY, A. S; LEE, W. L. Broken barriers: A new take on sepsis pathogenesis. *Sci Transl Med*, v. 3, n. 88, ps25, 2011.

GOODWIN, A. J.; Rice, D. A.; Simpson, K. N.; Ford, D.W.. Frequency, cost, and risk factors of readmissions among severe sepsis survivors. *Crit Care Med*, v. 43, n. 4, p. 738-46, Apr 2015.

GUBA, S. C.; STELLA, G.; TURKA, L. A.; JUNE, C. H.; THOMPSON, C. B.; EMERSON, S. G. Regulation of interleukin 3 gene induction in normal human T cells. *J Clin Invest*, v. 84, n. 6, p. 1701-06, Dec 1989.

HARBARTH, S. Nosocomial transmission of antibiotic-resistant microorganisms. *Curr Opin Infect Dis*, v. 14, p. 437-42, 2001.

HEUMANN, D.; ROGER, T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta*, v. 323, n. 1-2, p. 59-72, Sep 2002.

HILLAS, G.; VASSILAKOPOULOS, T.; PLANTZA, P.; RASIDAKIS, A.; BAKAKOS, P. C-reactive protein and procalcitonin as predictors of survival and septic shock in ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J*, v. 35, n. 4, p. 805-11, Apr 2010.

HOCHREITER, M. *et al.* Procalcitonin to guide duration of antibiotic therapy in intensive care patients: a randomized prospective controlled trial. *Crit Care*, v. 13, R83, 2009.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS (HC-UFMG). Estrutura física. 2016. Disponível em: <<http://www.ebserh.gov.br/web/hc-ufmg/infraestrutura>>. Acesso em 05 de junho de 2016.

HOTCHKISS, R. S.; SHERWOOD, E. R. Richard S. Getting sepsis therapy right: Is decreasing inflammation or increasing the host immune response the better approach? *Science*. v. 347, n. 6227, p. 1201-1202, Mar 2015.

HOWELL M. D.; DONNINO M.; CLARDY, P.; TALMOR, D.; SHAPIRO, N. I. Occult hypoperfusion and mortality in patients with suspected infection. *Int Care Med*, v. 33, p. 1892-99, 2007.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE (ILAS). Relatório Nacional – Protocolos Gerenciados de Sepsis. Sepsis grave e choque séptico 2005-2015. 2016. Disponível em: <<http://www.ilas.org.br/assets/arquivos/relatorio-nacional/relatorio-nacional.pdf>>. Acesso em 23 de junho de 2016.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE (ILAS). Spread – Sepsis Prevalence Assessment Database. 2014. Disponível em: <<http://www.sepsisnet.org/pg.php?v=spread>>. Acesso em 14 de março de 2016.

IWASHYNA, T. J.; Ely E. W.; Smith, D. M.; Langa, K. M. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA*, v. 304, n. 16, p. 1787-94, Oct 2010.

JANEWAY, C. A.; MIDZHITOV, R. Introduction: The role of innate immunity in the adaptative imune response. *Semin. Immunol*, v. 10, p. 349-50, 1998.

JENSEN, J. U.; HESLET, L.; JENSEN, T. H.; *et al.* Procalcitonin increase in early identification of critically ill patients at high risk of mortality. *Crit Care Med*, v. 34, p. 2596-602, 2006.

KARAM, G.; CHASTRE, J.; WILCOX, M. H.; VINCENT, J. L. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. *Crit Care*, v. 20, n. 136, Jun 2016.

KARLSSON, S.; *et al.* Predictive value of procalcitonin decrease in patients with severe sepsis: a prospective observational study. *Crit Care*, v. 14, n. 6, R205 2010.

KAUKONEM, K.M.; Bailey, M.; Pilcher, D.; Cooper, D. J.; Bellomo, R. Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria in Defining Severe Sepsis. *N Engl J Med*, Mar 2015.

KELLUM, J. A. *et al.* Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. *Arch Intern Med*, v. 167, n. 15, p. 1655-63, Aug 2007.

KUMAR, A.,*et al.* Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*, v. 34, n. 6, p. 1589-96, 2006.

LAI, C. K.; HO, S. S.; CHAN, C. H.; LEUNG, R.; LAI, K. N. Gene expression of interleukin-3 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor in circulating CD4+ T cells in acute severe asthma. *Clin Exp Allergy*, v. 26, n. 2, p. 138-46, Feb 1996.

LEVY, M. M. *et al.* International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*, v. 29, p. 4, p. 530-8, Apr 2002.

LEVY, M. M. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: association between performance metrics and outcomes in a 7.5-year study. *Crit Care Med*, v. 43, n. 1, 3-12, Jan 2015.

LISBOA, T.*et al.* C-reactive protein correlates with bacterial load and appropriate antibiotic therapy in suspected ventilator associated pneumonia. *Crit Care Med*, v. 36, n. 1, p. 166-171, 2008.

LOBO, S. M. A.; BOTA, D. P.; *et al.* C-reactive protein levels correlate with mortality and organ failure in critically ill patients. *Chest*, v. 123, p. 2043-9, 2003.

MARSHALL, J. C., *et al.* Measures, markers, and mediators: Toward a staging system for clinical sepsis. A Report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25–26, 2000. *Crit Care Med*, v. 31, n. 5, p. 1560-67, 2003.

MARSHALL, J. C., *et al.* Multiple Organ Dysfunction Score: A reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med*, v. 23, n. 10, p. 1638-52, Oct 1995.

MARSHALL, J. C. e REINHART, K. Biomarkers of sepsis. *Crit Care Med*, v. 37, n. 7, p. 2290-2298, 2009.

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*, v. 348, p. 1546-54, 2003.

MARTIN, G. S.; MANNINO, D. M.; MOSS, M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med*, v. 34, n. 1, p. 15-21, 2006.

MAYR, F. B. Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. *JAMA*, v. 303, n. 24, p. 2495-503, Jun 2010.

MIKKELSEN, M. E., *et al.* Serum lactate is associated with mortality in severe sepsis independent of organ failure and shock. *Crit Care Med*, v. 37, n. 5, p. 1670-7, May 2009.

NOBRE, V.; HARBARTH, S.; GRAF, J-D.; PUGIN, J. Use of procalcitonin to shorten antibiotic treatment duration in septic patients: a randomized trial. *Am J Resp Crit Care Med*, v. 177, n. 5, p. 498-505, 2008.

OBERHOLZER, A., *et al.* Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis. *Shock*, v. 23, n. 6, p. 488-93, Jun 2005.

OLIVEIRA, C. F., *et al.* Procalcitonin versus C-reactive protein for guiding antibiotic therapy in sepsis: a randomized trial. *Critical Care Medicine*, v. 41, n. 10, 2013.

PETTILÄ, V.; HYNNINEN, M.; TAKKUNEN, O.; KUUSELA, P.; VALTONEN, M. Predictive value of procalcitonin and interleukin 6 in critically ill patients with suspected sepsis. *Intensive Care Med*, v. 28, n. 9, p. 1220-5, Sep 2002.

PIERRAKOS, C.; VINCENT, J. L. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care*, v. 14, n. 1, R15, 2010.

PINSKY, M. R.; VINCENT, J. L.; DEVIERE, J.; ALEGRE, M.; KAHN, R. J.; DUPONT, E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest*, v. 103, n. 2, p. 565-75, Feb 1993.

PÓVOA, P. C-reactive protein: a valuable marker of sepsis. *Intensive Care Med*, v. 28, p. 235-243, 2002.

PÓVOA, P.; SALLUH, J.I. Biomarker-guided antibiotic therapy in adult critically ill patients: a critical review. *Annals of Intensive Care*, v. 2, n. 1, p. 32-40, 2012.

PÓVOA, P.; TEIXEIRA-PINTO, A. M.; CARNEIRO, A. H. C-reactive protein, an early marker of community-acquired sepsis resolution: a multi-center prospective observational study. *Critical Care*, v. 15, R169, 2011.

QUE, Y. A. *et al.* Prognostication of Mortality in Critically Ill Patients With Severe Infections. *Chest*, v. 148, n. 3, p. 674-82, Sep 2015.

RIVERS, E., *et al.* Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, v. 345, n. 18, p. 1368-77, Nov 2001.

RYU, J. A.; *et al.* Clinical Usefulness of Procalcitonin and C-Reactive Protein as Outcome Predictors in Critically Ill Patients with Severe Sepsis and Septic Shock. *PLoS One*, v. 10, n. 9, e0138150.

SADRAS, T., *et al.* Interleukin-3-mediated regulation of β -catenin in myeloid transformation and acute myeloid leukemia. *J Leukoc Biol*, v. 96, n. 1, p. 83-91, Jul 2014.

SANKAR, V.; WEBSTER N. R. Clinical application of sepsis biomarkers. *J Anesth*, v. 27, p. 1502-7, 2013.

SELIGMAN, R. *et al.* Decreases in procalcitonin and C-reactive protein are Strong predictors of survival in ventilator-associated pneumonia. *Crit Care*, 10:R125, 2006.

SEYMOUR, C. W., *et al.* Assessment of Clinical Criteria for Sepsis. For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, v. 315, n. 8, p. 762-74, 2016.

SHANKAR-HARI, M., *et al.*; for the Sepsis Definitions Task Force. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock. *JAMA*, v. 315, n. 8, p. 775-87, 2016.

SHAPIRO, N. I.; WOLFE, R. E.; MOORE, R. B.; SMITH, E.; BATES, D. W. Mortality in Emergency Department Sepsis (MEDS) score: a prospectively derived and validated clinical prediction rule. *Crit Care Med*, v. 31, n. 3, p. 670-5, Mar 2003.

SINGER, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, v. 315, n. 8, p. 801-10, Feb 2016.

The ARISE Investigators and the ANZICS Clinical Trial Group. Goal-Directed Resuscitation for Patients with Early Septic Shock. *N Engl J Med*, v. 371, p. 1496 – 1506, Oct 2014.

The ProCESS Investigators. A Randomized Trial of Protocol-Based Care for Early Septic Shock. *N Engl J Med*, v. 370, p. 1683-93, May 2014.

The ProMISe Trial Investigators. Trial of Early, Goal-Directed Resuscitation for Septic Shock. *N Engl J Med*, v. 372, p. 1301-11, Apr 2015.

ULEVITCH, R. J.; TOBIAS, P. S. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol*, v. 11, n. 1, p. 19-22, 1999.

VAN DER POLL, T.; OPAL, S. M. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis*, v. 8, n. 1, p. 32 – 43, Jan 2008.

VENTETUOLO, C. E.; MITCHELL, M. L. Biomarkers: Diagnosis and Risk Assessment in Sepsis. *Clin Chest Med*, v. 29, p. 591-603, 2008.

VINCENT, J. L. *et al.* Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med*, v. 2, n. 5, p. 380-6, May 2014.

VINCENT, J. L., *et al.* The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*, v. 22, n. 7, p. 707-10, Jul 1996.

WARD, N. S.; CASSERLY, B.; AYALA, A. The Compensatory Anti-inflammatory Response syndrome (CARS) in Critically ill patients. *Clin Chest Med*, v. 29, n. 4, p. 617, Dec 2008.

WEBER, G. F. *et al.* Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis. *Science*, v. 347, n. 6227, p. 1260-5, Mar 2015.

YANG, Y.C., *et al.* Human IL-3 (multi-CSF): identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3. *Cell*, v. 47, n. 1, p. 3-10, Oct 1986.

11. APÊNDICES

Apêndice 1 - Formulário individual para registro das características clínicas e laboratoriais

Coorte Sepsis – Fase II	
1-VARIÁVEIS SÓCIO-DEMOGRÁFICAS	
1.1- Nome:	
1.2- Iniciais: _ _ _ _ _	_ _ _ _
1.3- Número inclusão estudo: _ _ _ _	_ _ _
1.4 – Inclusão citometria e quimiotaxia: __ <i>0 – não 1 – sim</i> <i>Motivo não inclusão:</i> _____	_
1.5 – Número inclusão citometria e quimiotaxia: __	_ _
1.6- Data inclusão estudo: __/__/__	_ _ _ _ _
1.7- SAME: _ _ _ _ _	_ _ _ _ _ _
1.8- Data de nascimento: __/__/__	_ _ _ _ _
1.9- Data internação HC: __/__/__	_ _ _ _ _
1.10- Data internação CTI: __/__/__	_ _ _ _ _
1.11- Data alta HC: __/__/__	_ _ _ _ _
1.12- Data alta CTI: __/__/__	_ _ _ _ _
1.13- Sexo: __ <i>1- M 2- F</i>	_
Contatos telefônicos: Fixo: (____) _____ Celular: (____) _____ <u>Contato alternativo:</u> Nome: _____ Tel1: (____) _____ Tel2: (____) _____ Endereço:	Observações:

Rua/Av: _____ No.: _____ Complemento: _____ Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____. _____ - _____	
2-VARIÁVEIS CLÍNICAS À INCLUSÃO	
2.1 - Tipo de internação: __ 1. Clínica 2. Cirúrgica (pós ou pré- imediato de cirurgia eletiva ou urgência)	__
2.2 - Principal causa internação clínica em CTI 1. Insuf. respiratória 2. Insuf. cardíaca 3. Choque 4. Coma 5. Distúrbio hidroeletrólítico 6. Insuf. renal 7. SCA 8. PO cirurgia complicado fora do CTI 9. NSA Outras: _____	__
2.3 - Principal causa internação cirúrgica: __ 1. PO cirurgia urgência 2. PO eletivo alto-risco 9. NSA Sítio cirúrgico: _____	__
2.4 – Localização prévia: 1. Urgência 2. Outro CTI 3. Bloco 4. Enfermaria 5. Outro 9. NSA	__
2.5 – Uso de drogas vasoativas previamente a admissão em CTI: <i>0- não 2-sim 8- IGN</i>	__
2.6- APACHE II: __ __	__
2.7 – SAPS 3 admission Score: __ __ __	__
2.8- SOFA total: __ __	__
2.9- SOFA respiratório: __ PaO2/FiO2:	__
2.10- SOFA coagulação: __ Plaquetas:	__
2.11- SOFA hepático: __ Bilirrubina:	__
2.12- SOFA cardiovascular: __ PAM: Aminas:	__
2.13- SOFA neurológico: __ ECG:	__

2.14- SOFA renal: __ Creatinina:	__
2.15 – Episódio índice de sepse: __ 1. Primeiro episódio 2. Segundo episódio 3. Terceiro ou mais episódio	__
3-HISTÓRIA PREGRESSA/COMORBIDADES	
3.1- Insuficiência cardíaca congestiva (NYHA ≥ II e/ou FE < 40%): __ <i>0- não 1-sim 8- IGN</i>	__
3.2 História de neoplasia sólida ativa: __ <i>0- não 1-sim 2- sim e sob tratamento 8- IGN</i>	__
3.3 História de neoplasia hematológica ativa: __ <i>0- não 1-sim 2 – sim e sob tratamento 8- IGN</i>	__
3.4 História confirmada (relatório, exames) de doença neuro-degenerativa: __ <i>0- não 1-sim 8- IGN</i>	__
3.5- DPOC: __ <i>0- não 1-sim 8- IGN</i>	__
3.6- Cirrose hepática (confirmada, por ex., em seguimento ambulatorial específico): __ <i>0- não 1-sim 8- IGN</i>	__
3.7- Insuficiência renal crônica não Dialítica (Clearance < 60ml/min): __ <i>0- não 1-sim 8- IGN</i>	__
3.8- Insuficiência renal crônica Dialítica: __ <i>0- não 1-sim 8- IGN</i>	__
3.9- HAS: __ <i>0- não 1-sim 8- IGN</i>	__
3.10- Diabetes mellitus: __ <i>0- não 1-sim 8- IGN</i>	__
3.11- Uso de corticoides (referência ≥15mg/dia prednisona): __ <i>0- não 1-sim 8- IGN</i>	__
3.12- Uso de imunossupressores: __ <i>0- não 1 - sim 8- IGN</i>	__
3.13 – Infecção HIV (cels. CD4+ > 200): __	__

0- não 1-sim 8- IGN	
4 - DADOS MICROBIOLÓGICOS REFERENTES AO EPISÓDIO ÍNDICE DE SEPSE	
4.1- Tipo de infecção: __ 1. Comunitária 2. Nosocomial	_
4.2- Sítio de infecção: __ 1.Pulmonar 2.Intra-abdominal 3.Renal 4.Cateter 5.Partes moles 6.Neurológico 7.Indeterminado 11.Misto	_ _
4.3- Tipo de pneumonia: __ 1.Comunitária 2.Nosocomial não VAP 3.Nosocomial VAP 9.NSA	_
4.4- Confirmação microbiológica da sepse: __ 0.Não 1.Sim	_
4.5- Hemocultura positiva: __ 0.Não 1.Sim	_
4.6 – Outra cultura positiva: __ 0. Não 1. Sim	_
4.7- Germe isolado como causa da sepse_1: ____ (Tabela código)	_ _ _
4.8- Germe isolado como causa da sepse_2: ____ (Tabela código)	_ _ _
5- VARIÁVEIS LABORATORIAIS À INCLUSÃO	
5.1- Hb: ____,__g/L	_ _ , _
5.2- Leucócitos totais: _____	_ _ _ _ _ _ _
5.3- Neutrófilos: _____	_ _ _ _ _ _ _
5.4- Bastonetes: _____ cls/mm ³	_ _ _ _ _ _ _
5.5- Eosinófilos: _____ cls/mm ³	_ _ _ _ _ _ _
5.6- Plaquetas: _____ cls/mm ³	_ _ _ _ _ _ _
5.7- Lactato: ____,__ mmol/L	_ _ , _

5.8- PCR: __ __ __ mg/dL	_ _ _
5.9 Ureia: __ __ __	_ _ _
5.10- Creatinina: __ __, __	_ _ . _
5.11- pH: __, __	_ , _
5.12- RNI: __ __, __	_ _ , _
5.13-PTTa: __. __ vezes o controle	_ . _
5.14 – AST: ____	_ _ _
5.15 – ALT:	_ _ _
5.16 – IL-3: __ __, __	_ _ , _
6- INTERVENÇÕES TERAPÊUTICAS PRIMEIRAS 72h INCLUSÃO	
6.1- Uso de corticoide durante as primeiras 72h de inclusão: __ <i>0. não 1.sim</i>	_
6.2- Corticoide usado para choque séptico: __ <i>0. não 1.sim 9.NSA</i>	_
6.3 Uso de ventilação mecânica durante as primeiras 72h: __ <i>0. não 1.sim</i>	_
6.4- Tipo de ventilação mecânica: __ <i>0. invasiva 1. não invasiva 9. NSA</i>	_
6.5- Uso de aminas vasopressoras nas primeiras 72h: __ <i>0. não 1.sim</i>	_
6.6- Uso de inotrópicos positivos nas primeiras 72h: __ <i>0. não 1.sim</i>	_
6.6- Submetido a hemodiálise nas primeiras 72h: __ <i>0. não 1.sim</i>	_
7- SEGUIMENTO 3º. DIA INCLUSÃO	
DATA: _ _ _ _ _ _	
7.1- PCR: __ __ __	_ _ _
7.2 – IL-3: __ __, __	_ _ , _

7.3 - Lactato: __ __, __	_ _ , _
7.4 - Plaquetas: __ __ __	_ _ _ . _ _ _
7.5 – Global de leucócitos: __ __ __ __	_ _ _ _
7.6- SOFA total: __ __	_ _
7.7 – Resolução da febre: __ 0. não 1.sim 9.NSA	_
8 - SEGUIMENTO 7º. DIA INCLUSÃO	
DATA: _ _ _ _ _	
8.1- PCR: __ __ __	_ _ _
8.2 – IL-3: __ __, __	_ _ , _
8.3 - Lactato: __ __, __	_ _ , _
8.4 - Plaquetas: __ __ __	_ _ _ . _ _ _
8.5 – Global de leucócitos: __ __ __ __	_ _ _ _
8.6- SOFA total: __ __	_ _
8.7 – Resolução da febre: __ 0. não 1.sim 9.NSA	_
8.8 – Resposta terapêutica: __ 0. não 1. sim # Resolução febre + Queda SOFA 30%	_
9 – ANTIBIOTICOTERAPIA	
9.1 – ATB 1: __ __ __ (Tabela código)	_ _ _
9.2 – Tempo uso ATB 1: __ __	_ _
9.3 – ATB 2: __ __ __ (Tabela código)	_ _ _
9.4 - Tempo uso ATB 2: __ __	_ _
9.5 – ATB 3: __ __ __ (Tabela código)	_ _ _
9.6 – Tempo uso ATB 3: __ __	_ _
9.7 – Tempo total ATB: __ __	_ _
10 - DADOS FINAL SEGUIMENTO (28º. INCLUSÃO)	
DATA: _ _ _ _ _	
10.1 – Condição alta CTI: __	_

0. Óbito 1. Sobrevivente Data: _____	
10.2 – Condição alta HC (caso tenha recebido alta): ____ 0. Óbito 1. Sobrevivente Data: _____	__
10.3 - Condição no 28º. dia inclusão: ____ 0. óbito 1. Sobrevivente	__
10.4 - Se óbito, data: ____/____/____	__ _ _ _ _ _
10.5- Submetido à VM invasiva durante o seguimento: ____ 0. não 1.sim	__
10.6- Submetido à hemodiálise durante o seguimento: ____ 0. não 1.sim	__
11- DADOS 90º. DIA INCLUSÃO	DATA: __ _ _ _ _ _
11.1- Condição alta CTI: ____ 0. óbito 1. Sobrevivente	__
11.2- Condição alta HC (caso tenha recebido alta): ____ 0. óbito 1. sobrevivente	__
11.3- Condição no 90º. dia incluso: ____ 0. óbito 1. Sobrevivente	__
11.4 Se óbito, data: ____/____/____	__ _ _ _ _ _
12- DADOS 1 ANO INCLUSÃO	DATA: __ _ _ _ _ _
12.1- Condição 1 ANO: ____ 0. óbito 1. Sobrevivente	__

Apêndice 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Paciente

Projeto de pesquisa: Estudo da função endotelial e cardiovascular em pacientes portadores de sepse: implicações diagnósticas, definição de risco e terapêutica

Pesquisador responsável: Vandack Alencar Nobre Jr

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

A Universidade Federal de Minas Gerais convida o Sr. / a Sra. a participar de uma pesquisa sobre infecções graves (septicemia) causadas por bactérias. Muitas questões sobre esse tipo de doença permanecem desconhecidas pelos médicos. As infecções graves são motivo de diversas pesquisas no mundo todo. Os pesquisadores do Hospital das Clínicas da UFMG estão propondo uma pesquisa sobre essa doença. Trata-se de um projeto para conhecer melhor o problema e tentar descobrir formas de diagnosticá-lo mais rapidamente e tratar melhor os pacientes. Sabe-se que nos pacientes com septicemia ocorre uma significativa inflamação. Vários exames realizados no sangue podem ajudar a descobrir se esta inflamação está muito intensa e se terá maiores conseqüências. Além disso, o funcionamento de vários órgãos fica prejudicado quando o paciente tem uma infecção grave. Os pesquisadores da UFMG querem estudar o funcionamento do coração, dos vasos sanguíneos e do sistema neurológico nesses pacientes, utilizando exames que são feitos por cima da pele, e não doem, coleta de sangue para exames e avaliação clínica padronizada realizada por profissional capacitado. Este profissional aplicará alguns questionários e testes para investigar a presença de alterações da força muscular, da capacidade de raciocínio, da memória, da atenção e do comportamento. Não haverá nenhuma mudança no seu tratamento se você participar da pesquisa. Além disso, não se prevê benefícios diretos para você, caso você participe. Se você aceitar participar, serão coletadas amostras de seu sangue diariamente, juntamente com a coleta realizada todos os dias para exames de rotina. O sangue será enviado para o Laboratório do Hospital das Clínicas, onde serão realizadas dosagens de várias substâncias. Essas substâncias poderão ajudar a entender melhor o funcionamento do corpo nas infecções graves. Além disso serão separados dois tipos de células do sistema

de defesa contra infecções, as quais serão testadas em laboratório. Os pesquisadores querem saber como essas células estão funcionando. Essas células não serão utilizadas para qualquer tipo de procedimento do tipo clonagem ou algo parecido. Por fim, o sangue dos pacientes não será utilizado para outros fins e será descartado após os exames da pesquisa.

Os procedimentos propostos nesta pesquisa e os seus respectivos riscos são os seguintes:

1. Coleta de sangue: procedimento feito rotineiramente nos pacientes internados no CTI. A coleta de sangue apresenta riscos mínimos e pode causar:

- hematomas no local de coleta

- infecção no local de coleta

2. Ecocardiograma bidimensional: também frequentemente realizado em pacientes internados. Trata-se de exame não invasivo e que não traz qualquer risco ao paciente. Pode haver pequeno desconforto devido ao posicionamento do paciente, que às vezes deve ficar deitado de lado.

3. Aplicação de questionários e testes: sua aplicação não traz constrangimentos ao paciente e o único incômodo refere-se ao tempo de duração da entrevista, que pode durar aproximadamente 60 minutos. Esses testes só serão realizados a partir do momento em que o paciente apresente condições clínicas gerais melhores, para não deixá-lo fadigado.

Os pesquisadores assumem o dever de dar assistência aos participantes da pesquisa para problemas relacionados aos procedimentos citados acima ou mesmo para quaisquer outros problemas da saúde apresentados durante a pesquisa. Os registros (informações dos pacientes) serão mantidos de forma confidencial com códigos de identificação de acesso limitado e o nome do paciente não será mencionado em nenhum momento.

Eu tenho o direito de recusar ou cancelar o meu consentimento de participação a qualquer instante, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado, bastando comunicar a minha decisão aos organizadores da pesquisa.

EU, _____,
ENTENDI O QUE ME FOI PROPOSTO E TIVE OPORTUNIDADE DE
ESCLARECER MINHAS DÚVIDAS. ESTOU CIENTE E CONSINTO QUE SE
REALIZE COLETA DE SANGUE (50 ML DE SANGUE AO TODO). SEI QUE
OS RESULTADOS DO ESTUDO SERÃO MANTIDOS EM SIGILO, PODENDO
SER INFORMADOS SOMENTE A MINHA PESSOA. ESTOU CIENTE DE QUE
OS RESULTADOS SERÃO PUBLICADOS SOMENTE EM CONJUNTO, NÃO
PERMITINDO A IDENTIFICAÇÃO INDIVIDUAL.

Belo Horizonte, ___/___/_____

Assinatura

Impressão digital (se analfabeto – nesse caso ler o consentimento em voz alta
após explicá-lo)

Pesquisador responsável

Os telefones abaixo podem lhe ser úteis para esclarecimentos:

Pesquisadores:

1-Dr. Vandack Alencar Nobre Jr (Hospital das Clínicas): (31) 3409-9436 / 9831-0004. Av. Alfredo Balena, 190 – Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG – Santa Efigênia – Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 30130-100.

Alunos de Mestrado e Doutorado responsáveis:

1- Carolina Braga de Resende (Hospital das Clínicas): (31) 3409-9626. Av. Alfredo Balena, 190 – Centro de Terapia Intensiva do HC UFMG – Santa Efigênia

– Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 30130-100.

2-Isabela Borges (Hospital das Clínicas): (31) 3409-9626.

Av. Alfredo Balena, 190 – Centro de Terapia Intensiva do HC UFMG – Santa Efigênia – Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 30130-100.

Comitês de Ética em Pesquisa:

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP: Telefax (31) 3409-4592 Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2o andar, sl 2005 – Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 31270-901.

Apêndice 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Familiar

Projeto de pesquisa: Estudo da função endotelial e cardiovascular em pacientes portadores de sepse: implicações diagnósticas, definição de risco e terapêutica

Pesquisador responsável: Vandack Alencar Nobre Jr

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

A Universidade Federal de Minas Gerais convida o o(a) seu(sua) familiar / amigo(a) a participar de uma pesquisa sobre infecções graves (septicemia) causadas por bactérias. Muitas questões sobre esse tipo de doença permanecem desconhecidas pelos médicos. As infecções graves são motivo de diversas pesquisas no mundo todo. Os pesquisadores do Hospital das Clínicas da UFMG estão propondo uma pesquisa sobre essa doença. Trata-se de um projeto para conhecer melhor o problema e tentar descobrir formas de diagnosticá-lo mais rapidamente e tratar melhor os pacientes. Sabe-se que nos pacientes com septicemia ocorre uma significativa inflamação. Vários exames realizados no sangue podem ajudar a descobrir se esta inflamação está muito intensa e se terá maiores conseqüências. Além disso, o funcionamento de vários órgãos fica prejudicado quando o paciente tem uma infecção grave. Os pesquisadores da UFMG querem estudar o funcionamento do coração, dos vasos sanguíneos e do sistema neurológico nesses pacientes, utilizando exames que são feitos por cima da pele, e não doem, coleta de sangue para exames e avaliação clínica padronizada realizada por profissional capacitado. Este profissional aplicará alguns questionários e testes para investigar a presença de alterações da força muscular, da capacidade de raciocínio, da memória, da atenção e do comportamento. Não haverá nenhuma mudança no tratamento se ele/ela participar da pesquisa. Além disso, não se prevê benefícios diretos, caso ele/ela participe. Se você autorizar a participação do(a) seu(sua) familiar / amigo(a), serão coletadas amostras de sangue diariamente, juntamente com a coleta realizada todos os dias para exames de rotina. O sangue será enviado para o Laboratório do Hospital das Clínicas, onde serão realizadas dosagens de várias substâncias. Essas substâncias poderão ajudar a entender melhor o funcionamento do corpo nas infecções graves. Além disso

serão separados dois tipos de células do sistema de defesa contra infecções, as quais serão testadas em laboratório. Os pesquisadores querem saber como essas células estão funcionando. Essas células não serão utilizadas para qualquer tipo de procedimento do tipo clonagem ou algo parecido. Por fim, o sangue dos pacientes não será utilizado para outros fins e será descartado após os exames da pesquisa.

Os procedimentos propostos nesta pesquisa e os seus respectivos riscos são os seguintes:

1. Coleta de sangue: procedimento feito rotineiramente nos pacientes internados no CTI. A coleta de sangue apresenta riscos mínimos e pode causar:

- hematomas no local de coleta
- infecção no local de coleta

2. Ecocardiograma bidimensional: também frequentemente realizado em pacientes internados. Trata-se de exame não invasivo e que não traz qualquer risco ao paciente. Pode haver pequeno desconforto devido ao posicionamento do paciente, que às vezes deve ficar deitado de lado.

3. Aplicação de questionários e testes: sua aplicação não traz constrangimentos ao paciente e o único incômodo refere-se ao tempo de duração da entrevista, que pode durar aproximadamente 60 minutos. Esses testes só serão realizados a partir do momento em que o paciente apresente condições clínicas gerais melhores, para não deixá-lo fadigado.

Os pesquisadores assumem o dever de dar assistência aos participantes da pesquisa para problemas relacionados aos procedimentos citados acima ou mesmo para quaisquer outros problemas da saúde apresentados durante a pesquisa. Os registros (informações dos pacientes) serão mantidos de forma confidencial com códigos de identificação de acesso limitado e o nome do paciente não será mencionado em nenhum momento.

Eu tenho o direito de recusar ou cancelar o meu consentimento de participação a qualquer instante, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado, bastando comunicar a minha decisão aos organizadores da pesquisa.

EU, _____, _____
DO PACIENTE _____
ENTENDI O QUE ME FOI PROPOSTO E TIVE OPORTUNIDADE DE
ESCLARECER MINHAS DÚVIDAS. ESTOU CIENTE E CONSINTO QUE SE
REALIZE COLETA DE SANGUE (50 ML DE SANGUE AO TODO). SEI QUE
OS RESULTADOS DO ESTUDO SERÃO MANTIDOS EM SIGILO, PODENDO
SER INFORMADOS SOMENTE AO MEU(MINHA) FAMILIAR / AMIGO(A).
ESTOU CIENTE DE QUE OS RESULTADOS SERÃO PUBLICADOS
SOMENTE EM CONJUNTO, NÃO PERMITINDO A IDENTIFICAÇÃO
INDIVIDUAL.

Belo Horizonte, ___/___/_____

Assinatura

Impressão digital (se analfabeto – nesse caso ler o consentimento em voz alta
após explicá-lo)

Pesquisador responsável

Os telefones abaixo podem lhe ser úteis para esclarecimentos:

Pesquisadores:

1-Dr. Vandack Alencar Nobre Jr (Hospital das Clínicas): (31) 3409-9436 / 9831-0004. Av. Alfredo Balena, 190 – Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG – Santa Efigênia – Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 30130-100.

Alunos de Mestrado e Doutorado responsáveis:

1- Carolina Braga de Resende (Hospital das Clínicas): (31) 3409-9626. Av. Alfredo Balena, 190 – Centro de Terapia Intensiva do HC UFMG – Santa Efigênia

– Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 30130-100.

2-Isabela Borges (Hospital das Clínicas): (31) 3409-9626.

Av. Alfredo Balena, 190 – Centro de Terapia Intensiva do HC UFMG – Santa Efigênia – Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 30130-100.

Comitês de Ética em Pesquisa:

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP: Telefax (31) 3409-4592 Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2o andar, sl 2005 – Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 31270-901.

12. ANEXOS

Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 0319.0.203.000-11

Interessado(a): **Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.**
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP analisou e aprovou, no dia 29 de julho de 2014, as alterações, abaixo relacionadas, no projeto de pesquisa intitulado "Estudo da função endotelial e cardiovascular em pacientes portadores de sepse: implicações diagnósticas, definição de risco e terapêutica":

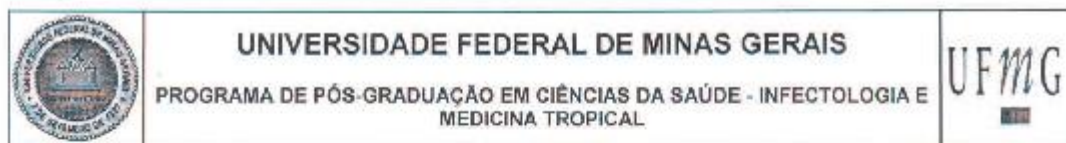
1. Avaliação oftalmológica completa; exame clínico, realizado por oftalmologista, no próprio CTI, ou seja, sem necessidade de transporte do paciente para o setor de oftalmologia;
2. Coleta de sangue total para separação de:
 - 2.1 Células mononucleares do sangue periférico (CMSP): avaliar a apoptose celular e viabilidade dessas células, bem como características da via do inflamossoma e da produção de citocinas in vitro (os resultados serão correlacionados com a gravidade e prognóstico dos pacientes);
 - 2.2 Neutrófilos; este estudo pretende avaliar o perfil de ativação e capacidade de migração de neutrófilos, avaliar vias de sinalização da P13K nos neutrófilos através de marcação de atividade de Akt/PKB e sua fosforilação e, por fim, avaliar o efeito do tratamento de inibidores na via da P13K no recrutamento de neutrófilos provenientes de pacientes com sepse;
 - 2.3 estudo da função dos neutrófilos na sepse através da realização de ensaios de marcadores de membrana celular e de moléculas relacionadas à via de sinalização da P13K;
3. Dosagem de alguns micro RNAs (miRNA 150, miRNA 574-5p, miRNA 133* e miRNA 193b) no plasma, que serão testados em relação à gravidade da sepse e ao prognóstico dos pacientes;
4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para familiar ou responsável;
5. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o paciente.

A aprovação é válida por dois anos (de 29 de julho de 2014 a 28 de julho de 2017).

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



Prof. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

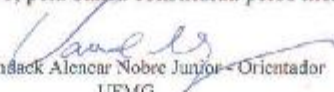
Anexo 2 – Folha de aprovação**FOLHA DE APROVAÇÃO**


"Avaliação do nível sérico de Interleucina-3 como marcador prognóstico na sepsé"

ISABELA NASCIMENTO BORGES

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo colegiado, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Medicina pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.

Aprovada em 26 de agosto de 2016, pela banca constituída pelos membros:

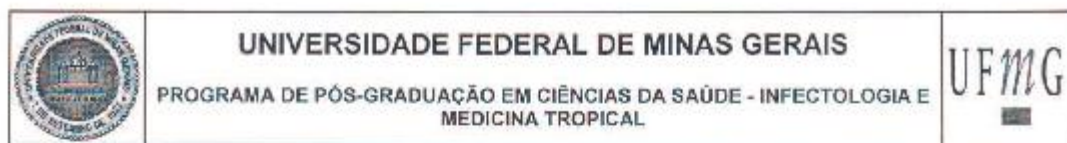

Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior - Orientador
UFMG


Prof. Luciana Cristina dos Santos Silva
UFMG


Prof. Cássia Righy Shinotsuka
Fiocruz

Belo Horizonte, 26 de agosto de 2016.

Anexo 3 – Ata de defesa



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA ISABELA NASCIMENTO BORGES

Realizou-se, no dia 26 de agosto de 2016, às 14:00 horas, Sala de Teleconferência - 1º andar do Hospital das Clínicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 301ª defesa de dissertação, intitulada "*Avaliação do nível sérico de Interleucina-3 como marcador prognóstico na sepse*", apresentada por ISABELA NASCIMENTO BORGES, número de registro 2014719033, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina pelo Programa de Pós-Graduação em ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Vandack Alencar Nobre Junior - Orientador (UFMG), Profa. Luciana Cristina dos Santos Silva (UFMG) e Profa. Cássia Righy Shinotsuka (Fiocruz).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, foi lavrada a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 26 de agosto de 2016.


 Prof. Vandack Alencar Nobre Junior


 Profa. Lúcia Cristina dos Santos Silva


 Profa. Cássia Righy Shinotsuka