

**Rui Pedro Lopes dos Santos**



## **Marcadores Bioquímicos de Sepsis**

**Universidade Fernando Pessoa**

**Faculdade de Ciências da Saúde**

**Porto 2014**

## Marcadores Bioquímicos de Sepsis

Marcadores Bioquímicos de Sepsis

**Rui Pedro Lopes dos Santos**



**Marcadores Bioquímicos de Sepsis**

**Universidade Fernando Pessoa**

**Faculdade de Ciências da Saúde**

**Porto 2014**

# Marcadores Bioquímicos de Sepsis

Rui Pedro Lopes dos Santos

Marcadores Bioquímicos de Sepsis

Atesto a originalidade do trabalho:

---

Trabalho de conclusão de ciclo apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora:

Professora Cristina Almeida

## Resumo

A sepsis é uma reação sistêmica grave que leva muitas vezes o paciente à morte. É uma complexa cadeia de eventos que envolve processos inflamatórios e não inflamatórios, reações humorais e celulares e anormalidades circulatórias. Esta resposta origina-se não só pela presença de um agente patogénico mas principalmente pela resposta exuberada do organismo a esse agente externo que provoca lesões em tecidos e órgãos e que é a maior causa dos problemas. Devido à sua agressividade, é necessário um rápido diagnóstico, e para tal, tem-se recorrido a biomarcadores específicos para este quadro.

Biomarcadores são entidades objetivamente medidas e avaliadas como um indicador de processos biológicos normais, processos patológicos ou resposta farmacológicas a uma determinada terapêutica.

**Palavras-Chave:** Sepsis, biomarcadores, infeção, inflamação, sepsis severa, choque séptico.

## **Abstract**

Sepsis is a severe systemic reaction that often leads the patient to death. It is a complex chain of events involving inflammatory and non-inflammatory processes, humoral and cell reactions and circulatory abnormalities. This response arises not only by the presence of a pathogen but mainly by exaggerated body's response to this foreign agent that causes lesions in tissue and organs and is the major cause of the problems. Due to its aggressive, rapid diagnosis is needed and for this it has been resorted to specific biomarkers for this illness.

Biomarkers are characteristics objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathological processes, or pharmacological response to a particular therapy.

**Keywords:** Sepsis, biomarkers, infection, inflammation, severe sepsis, septic shock.

## **Agradecimentos**

Muitas pessoas contribuíram direta ou indiretamente para a realização da minha tese e a todas essas pessoas.

Quero agradecer à minha orientadora, a Professora Cristina Almeida por toda a disponibilidade e apoio que me deu.

Quero agradecer aos meus familiares pelos conselhos, apoio e dedicação.

E por fim também quero agradecer aos meus amigos que também me ajudaram sempre que precisei.

## Abreviaturas

- ADN- *Deoxyribonucleic acid.*
- ATP- *Adenosine triphosphate.*
- CD64- *Cluster of differentiation 64.*
- CRP- *C-Reactive protein.*
- DAMPs- *Danger-associated molecular patterns.*
- Endocan- *Endothelial cell-specific molecule-1.*
- GB- *Glóbulos Brancos*
- HMGB1- *High-mobility-group box 1.*
- IL- *Interleukin.*
- LBP- *Lipopolysaccharide binding protein.*
- MIF- *Macrophage migration inhibitory factor.*
- NET- *Neutrophil extracellular traps.*
- NOD-LR- *Nucleotide oligomerization domain-like receptor.*
- PAMPs- *Pathogen-associated molecular patterns.*
- PCR- *Polymerase chain reaction.*
- PCT- *Procalcitonin.*
- PRRs- *Pattern recognition receptors.*
- sTREM-1 - *Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1.*
- suPAR- *Soluble urokinase plasminogen activator receptor.*
- TLRs- *Toll-like receptor.*
- TNF- *Tumor necrosis factor.*

## Índice

**Índice de Figuras.....XI**

**Índice de Imagens.....XII**

**Capítulo I- Introdução.....1**

1.1 Enquadramento.....1

1.2 Objectivos.....2

1.3 Estrutura.....3

**Capítulo II- Desenvolvimento.....4**

2.1 Resposta Inflamatória.....4

2.2 Sepsis.....6

2.2.1- Diferença entre SIRS e Sepsis.....11

2.3 Biomarcadores.....12

2.3.1 Proteína C-Reativa.....13

2.3.2 Procalcitonina.....15

2.3.3 Proteína de ligação aos lipopolissacarídeos.....19

2.3.4 Pentraxinas.....21

2.3.5 Fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor- TNF*) e interleucina-1 (IL-1).....23

2.3.6 Interleucina 6.....25

2.3.7 Interleucina 8.....26

2.3.8 Interleucina 12.....28

2.3.9 Fator de inibição de migração de macrófagos.....29

2.3.10 Interleucina 10.....30

2.3.11 *High-mobility-group box 1*.....31

## Marcadores Bioquímicos de Sepsis

2.3.12 <i>Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1</i> ...	32
2.3.13 <i>Soluble urokinase plasminogen activator receptor</i> .....	35
2.3.14 CD64.....	36
2.3.15 Lactato.....	37
2.3.16 Endocan.....	38
2.3.17 Agentes patogénicos e seus derivados como biomarcadores..	39
<b>Capítulo III- Conclusões.....</b>	<b>40</b>
<b>Capítulo IV- Referências Bibliográficas.....</b>	<b>42</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> Diferenciação entre diferentes estados se doença.....	2
<b>Figura 2</b> Mecanismos específicos e não específicos.....	4
<b>Figura 3</b> Resposta inflamatória ao tecido lesado.....	5
<b>Figura 4</b> Inflamação iniciada por estímulos de PAMPs e DAMPs.....	7
<b>Figura 5</b> Esquema explicativo dos efeitos benéficos a nível local e maléficos a nível sistémicos da vasodilatação, recrutamento de leucócitos e coagulação com formação de NET.....	8
<b>Figura 6</b> Diferença entre sepsis e SIRS.....	11
<b>Figura 7</b> Respostas sistémicas em sepsis e possíveis biomarcadores.....	12

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> Sensibilidade e especificidade de Marcado.....	<b>15</b>
<b>Tabela 2</b> Sensibilidade e especificidade de CRP, PCR e GB .....	<b>16</b>
<b>Tabela 3</b> Sensibilidade e especificidade de PCT, IL-6 e Il-8 .....	<b>25</b>
<b>Tabela 4</b> Valores em pacientes com sepsis e SIRS .....	<b>33</b>
<b>Tabela</b> Sensibilidade e especificidade de STREM, PCT e CRP <b>5</b> .....	<b>33</b>
<b>Tabela 6</b> Sensibilidade e especificidade de STREM e PCT .....	<b>34</b>
<b>Tabela 7</b> Níveis de Endocan .....	<b>38</b>
<b>Tabela 8</b> Resumos das aplicações dos biomarcadores estudados .....	<b>41</b>

# Capítulo I- Introdução

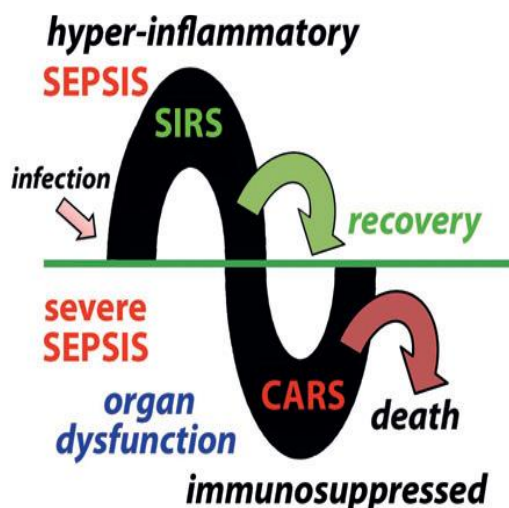
## 1.1- Enquadramento:

A sepsis é uma reação sistémica grave que leva muitas vezes o paciente à morte. É mais letal nos pacientes mais idosos por isso à medida que a população envelhece existe uma tendência para o aumento de número de casos (Faix 2013). Também apresenta maior severidade em recém-nascidos.

A sepsis é uma síndrome de uma resposta inflamatória sistémica na presença de uma infeção e a deteção baseia-se no cumprimento 2 ou mais critérios associados a essa síndrome (SIRS- *systemic inflammatory response syndrome*) juntamente com a existência de uma infeção. Os critérios são os seguintes:

- Temperatura corporal acima de 38° ou abaixo de 36°.
- Batimentos cardíacos acima de 90 batimentos por minuto.
- Mais de 20 inspirações por minuto.
- Contagem de células brancas elevada ou baixa ou 10% de neutrófilos imaturos.

Destes critérios para além de necessitar de apresentar dois, um deles tem que ser o primeiro ou o último dos apresentados acima (Faix 2013). Quando para além dos critérios de definição de sepsis também existem evidências de disfunção de algum órgão a sepsis é considerada sepsis severa. Já quando ocorre sepsis e disfunção cardiovascular, é dada a designação de choque séptico (Goldstein *et al.*, 2005) (Figura 1).



**Figura 1:** Diferenciação entre diferentes estados se doença. Adaptado de Faix, 2013.

A sepsis é uma complexa cadeia de eventos que envolve processos inflamatórios e não inflamatórios, reações humorais e celulares e anormalidades circulatórias (Pierrakos e Vincent, 2010). Esta resposta origina-se não só pela presença de um agente patogénico mas principalmente pela resposta exuberada do organismo a esse agente externo que provoca lesões em tecidos e órgãos e que é a maior causa dos problemas. Quando se instala a infeção sistémica, ocorre um aumento de processos pró-inflamatórios de modo a tentar eliminar a infeção e a retirar o tecido infetado. Numa segunda fase, ocorre um fenómeno anti-inflamatório de maneira a fazer um controlo dos efeitos da fase pró-inflamatória. É nesta fase que o sistema imunitário fica fragilizado devido a fenómenos de imunossupressão e o individuo fica sujeito a contrair outra infeção ou a recair de uma infeção anterior (Rudiger *et al.*, 2008).

O diagnóstico da sepsis é difícil pois os sinais são altamente variáveis e não-específicos. Para além deste fator, ainda não existe um tratamento eficaz para a reação inflamatória propriamente dita (Faix, 2013) por isso começaram a ser estudados bio marcadores na tentativa de indicar a presença ou ausência de sepsis e também a sua severidade e na tentativa de diferenciar infeção bacteriana de vírica ou fúngica e ainda mais importante diferenciar sepsis de SIRS.

## 1.2- Objectivos:

Esta tese tem como objetivo compreender melhor os mecanismos da sepsis, os critérios para a sua definição e as formas como se faz o seu diagnóstico recorrendo a biomarcadores que sofrem alterações quando este quadro se instala.

### **1.3- Estrutura do trabalho:**

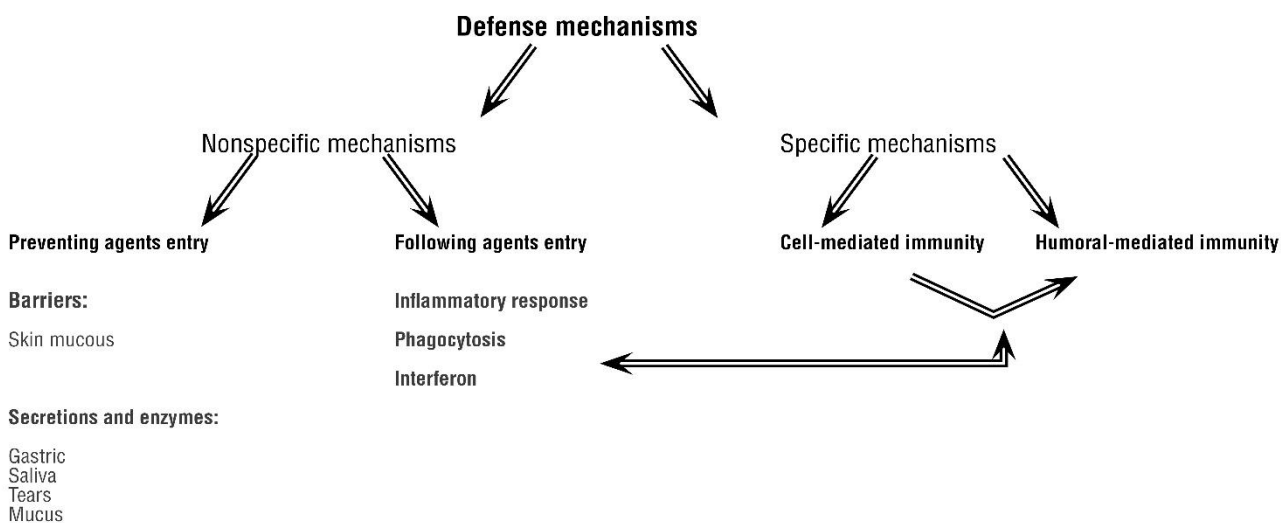
De forma a cumprir os objetivos propostos, este trabalho encontra-se dividido em 3 partes, sendo essas partes as seguintes:

- Introdução onde se apresenta o tema a expor junto com os seus objetivos.
- Desenvolvimento onde são abordados os principais temas recorrendo a dados bibliográficos retirados de sítios da internet como o PubMed e o PubMed Central. O motor de pesquisa “Google Scholar” também foi utilizado para pesquisa de artigos. Também foi realizada uma pesquisa em livros científicos.
- Conclusões onde é feita uma apreciação geral do tema.

## Capítulo II- Desenvolvimento

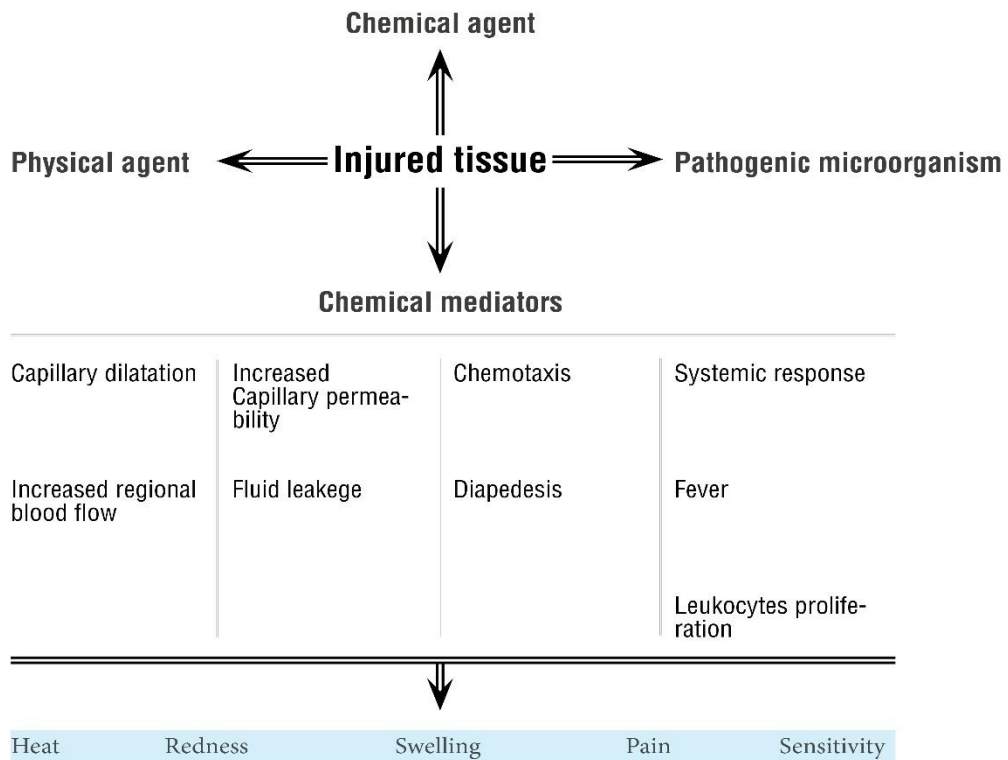
### 2.1- Resposta Inflamatória

Em condições normais, todos os indivíduos apresentam defesas no organismo contra a presença de microrganismos nocivos. Dentro desses sistemas de defesas naturais podemos distinguir dois: os mecanismos não específicos e os mecanismos específicos. Nos mecanismos não específicos, encontram-se os que impedem a entrada de agentes patogênicos que são as barreiras como a pele e as mucosas e secreções e enzimas como a saliva e as lágrimas, e ainda mecanismos que reagem após a entrada do agente. Fazendo parte deste último mecanismo de defesa temos, por exemplo, a fagocitose, a secreção de interferão e a resposta inflamatória. Dentro dos mecanismos específicos, encontram-se a imunidade mediada por células e a imunidade humoral (Figura 2).



**Figura 2:** Mecanismos específicos e não específicos. Adaptado de Silva *et al.*, 2006

A resposta inflamatória começa com uma lesão provocada pela entrada de agentes químicos, agentes físicos e agentes patogênicos. Aquando dessa entrada, vai ser libertado no organismo mediadores químicos de forma a conter a ameaça pois vão promover a dilatação capilar, o aumento da permeabilidade capilar, quimiotaxia, diapedese, proliferação de linfócitos e febre, que por sua vez, vão causar no organismo em questão dor, aumento da sensibilidade, inchaço e vermelhidão (Figura 3).



**Figura 3:** Resposta inflamatória ao tecido lesado. Adaptado de Silva *et al.*, 2006

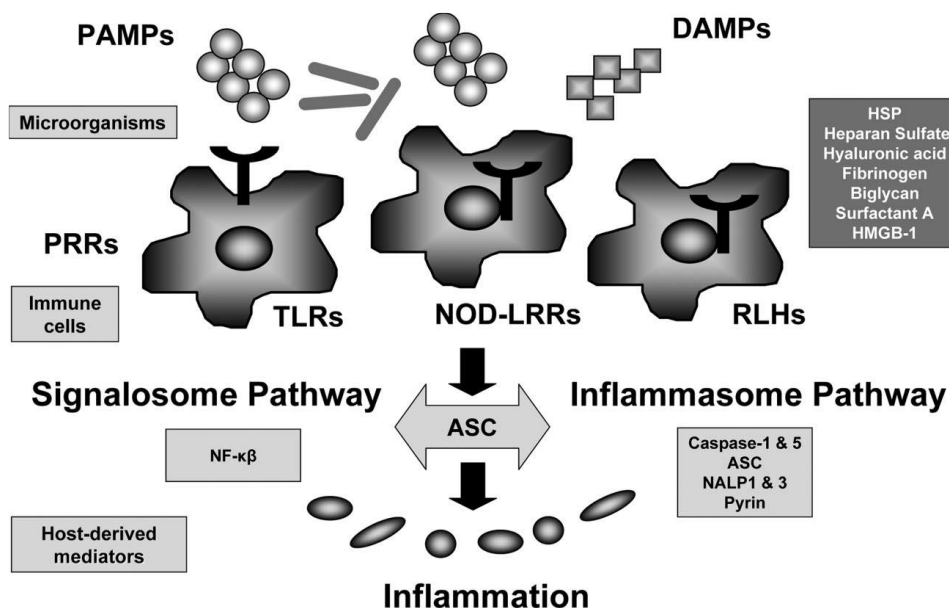
Esta resposta vai provocar a libertação de citocinas que por sua vez vão recrutar macrófagos e neutrófilos e ativar células endoteliais (Silva *et al.*, 2006). Isto vai levar à ativação parácrina e autócrina que vai despoletar a ativação das cascatas de coagulação que, por sua vez, originam fenómenos trombóticos. Estes acontecimentos descritos acima são designados por primeiro estágio. Normalmente as respostas inflamatórias não ultrapassam este estágio devido ao equilíbrio entre fenómenos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios que se mantêm em homeostasia. Quando pequenas quantidades de citocinas conseguem entrar na circulação é perdido esse estado de equilíbrio e ocorre uma amplificação da resposta. Esse é designado por segundo estágio. Ao ocorrer essa perda de homeostasia ocorre uma resposta sistémica massiva com efeitos destrutivos das citocinas levando a um estado de SIRS.

Instalado esse estado, ocorre vasodilatação sistémica levando a hipotensão, aumento da permeabilidade vascular sistémica que por sua vez origina edemas, depressão da contração do miocárdio que provoca dano microvascular e lesões nos miócitos (Davis e Hagen, 1997).

## 2.2- Sepsis

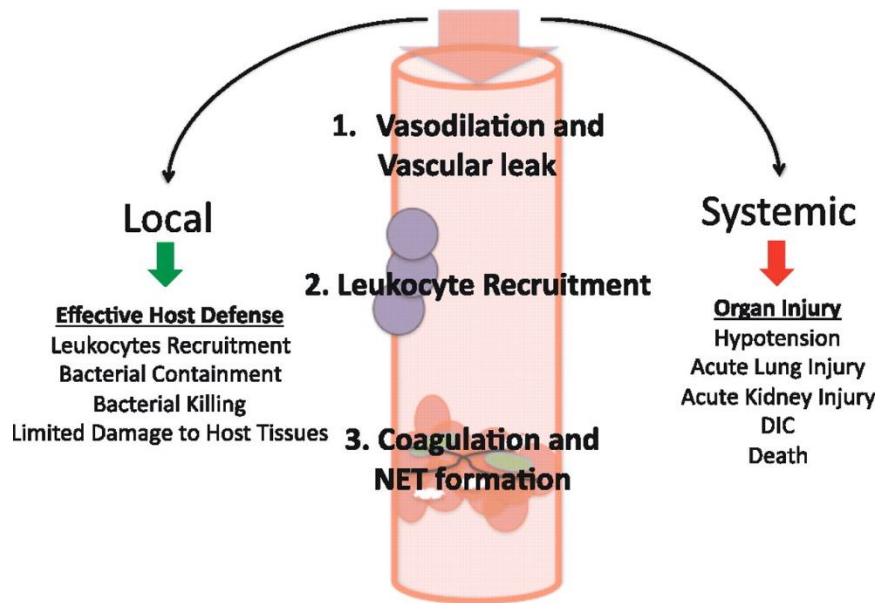
A sepsis está dependente de fenómenos relativos à virulência do agente infeccioso e também a fenómenos de resposta imunológica do hospedeiro. Como foi referido acima, nesta resposta normalmente começa por haver uma fase pró-inflamatória seguida de uma fase anti-inflamatória. A fase pró-inflamatória é normalmente exuberada e provoca danos nos tecidos e a fase anti-inflamatória provoca uma imunossupressão que pode levar o indivíduo a desenvolver outras doenças oportunistas (Perl *et al.*, 2006). Quando o equilíbrio entre os mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios fica comprometido, a sepsis desenvolve-se (se tiver por causa um microorganismo).

Os agentes patogénicos como por exemplo bactérias, vírus, parasitas entre outros, possuem moléculas na sua superfície designadas por PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) (as bactérias não patogénicas e comensais também possuem este tipo de moléculas) que se vão ligar ao PRRs (pattern recognition receptors) do indivíduo originando uma resposta (Namas *et al.*, 2012). Para além dos PAMPs, que são de origem exógena, existem outras moléculas de origem endógena capazes de se ligar aos PRRs e são designadas por DAMPs (danger-associated molecular patterns). Essas moléculas são libertadas quando ocorre um trauma ou lesão no organismo como, por exemplo, uma fratura de algum osso ou trauma hemorrágico. Ao ocorrer a ligação de PAMPs ou DAMPs aos PRRs, vai ocorrer uma resposta parecida com a resposta séptica mas que na verdade não o é pois trata-se de uma inflamação estéril (Ward 2012). Como exemplos de DAMPs temos o DNA mitocondrial que é reconhecido por um recetor designado TLR9. Outras moléculas DAMPs são, por exemplo, as histonas H3 e H4 (Figura 4).



**Figura 4:** Inflamação iniciada por estímulos de PAMPs e DAMPs. Adaptado de Cinel e Opal, 2009.

Quando ocorre uma infecção local, as defesas do organismo entram em ação e tentam um rápido controle sobre a mesma, e é o que normalmente acontece. Mas, por vezes, os micro-organismos conseguem ultrapassar estas defesas e amplificar a infecção que anteriormente era local tornando-a numa inflamação sistémica. Para acompanhar esta amplificação da infecção, o organismo amplifica também as suas respostas e o que a nível local era positivo passa a ser negativo a nível sistémico como, por exemplo a vasodilatação sistémica que leva ao choque séptico ou a ativação sistémica de neutrófilos e monócitos que leva à lesão aguda do rim e do pulmão. Apesar da resposta sistémica ser importante em muitos casos, quando ocorre de forma desequilibrada, pode levar a consequências graves (Figura 5).



**Figura 5:** Esquema explicativo dos efeitos benéficos a nível local e maléficos a nível sistémicos da vasodilatação, recrutamento de leucócitos e coagulação com formação de NET. Adaptado de Seeley *et al.*, 2012.

Para ocorrer sepsis, é necessário que o sistema imunitário inato (não específico) seja ativado. Este sistema inato é aquele com que o indivíduo já nasce e dele fazem parte por exemplo os macrófagos, monócitos, basófilos, etc. Esta ativação é feita por três famílias de PRRs, que são recetores que vão reconhecer moléculas estranhas. Os TLRs (tool-like receptors), os NOD-LR e ativadores de caspase citoplasmática. Estas famílias ativam o sistema inato que, por sua vez, vai regular o sistema imunitário adaptativo (específico) que é o sistema imunitário que se vai modulando à medida que organismo é apresentado a novos antígenos. Elas são fortemente expressas tanto em células do sistema inato como do sistema adaptativo e também em células endoteliais e epiteliais. A família mais estudada são os TLRs e no humano são conhecidos 10 até ao momento. Os TLRs 1, 2, 4, 5, e 6 são expressos na superfície celular e reconhecem uma grande variedade de moléculas da superfície celular de agentes estranhos como bactérias, vírus, fungos, etc. Por sua vez os TLRs 3, 7, 8 e 9 são expressos no retículo endoplasmático e em endossomas onde reconhecem ácidos nucleicos microbianos. Desses TLRs o mais estudado é o TLR4 que é muito eficaz na resposta a bactérias gram-negativas devido à presença de lipopolissacarídeos nessas bactérias. Quando este TLR se liga ao lipopolissacarídeo, forma um complexo que provoca a translocação nuclear de AP-1, NF-

KB e IRF3 que são fatores de transcrição que se vão ligar a regiões promotoras de citocinas tais como fator de necrose tumoral, interleucina 1B e interleucina 6, regiões promotoras de quimocinas, de intermediários reativos de oxigénio e sintetase do óxido nítrico. Este fenómeno vai ajudar a atrair neutrófilos e monócitos para o local da infeção.

Um dos grandes ativadores da resposta do hospedeiro à infeção e ao dano é o inflamassoma. O inflamassoma é um complexo macromolecular que é necessário para a ativação da caspase-1 e a clivagem do pro-IL-1B inativo para a sua forma ativa. São “montados” de forma diferente dependendo do PRR que foi ativado. Quando operacional, esta macromolécula ativa a caspase-1 que, por sua vez vai clivar membros da família IL-1 tais como IL-1B e IL-18 nas suas formas ativas. A IL-1B é uma proteína inflamatória pirogénica que aumenta a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, o que aumenta o recrutamento de neutrófilos e monócitos ao local de infeção. Por outro lado, a IL-18 não é pirogénica e induz a expressão de interferão  $\gamma$  e pelas células T e natural killers. Durante a sepsis, os inflamassomas servem para amplificar a sinalização da inflamação, em que a sua extensão está dependente da duração da ativação dos inflamassomas.

Na sepsis também são de elevada importância uns corpúsculos designados de plaquetas. As plaquetas contribuem para a formação de coágulos e para manter a homeostasia mas também apresentam um papel na defesa do organismo e na fisiopatologia da sepsis. Expressam TLR2, TLR4 e TLR9 o que lhes permite detetar diretamente patógenos invasores. Quando ativadas, as plaquetas matam diretamente os patógenos através da libertação de proteínas microbidas como, por exemplo, as trombocidinas que estão armazenadas nos grânulos plaquetários. Para além de neutralizar diretamente agentes invasores, as plaquetas também regulam a função das células endoteliais e dos leucócitos. Quando o TLR4 é estimulado, as plaquetas ligam-se ao endotélio e “sequestram” neutrófilos o que aumenta o seu recrutamento e também aumenta a sua capacidade bactericida por aumentar os níveis de TNF, por secretar IL-1B e por secretar tromboxano A. Este tipo de mecanismos é positivo quando se trata de uma infeção localizada mas quando se trata de uma infeção sistémica, pode piorar a lesão pulmonar, diminuir o fluxo microvascular de sangue e induzir disfunção do miocárdio. Os lipopolissacarídeos e citocinas inflamatórias aumentam a adesão plaquetária ao endotélio e, para além disso, os lipopolissacarídeos também aumentam a expressão do fator tecidual nas células endoteliais e nos monócitos levando à ativação da cascata de

coagulação. Estas reações à presença de lipopolissacarídeos leva ao aumento de agregação plaquetária e à formação de microtrombos (Seeley *et al.*, 2012).

Os mastócitos são também agentes importantes pois quando ocorre infecção sofrem desgranulação e libertam IL-6 e TNF que recrutam neutrófilos e monócitos que durante a infecção local são benéficos mas a nível sistémico não o são. Quando mastócitos longe do local de infecção começam a desgranular, levam a um aumento da infecção sistémica e promovem fenómenos de apoptose nos linfócitos o que piora o quadro de sepsis pois o organismo fica sujeito a uma infecção oportunista (Seeley *et al.*, 2012).

Em conjunto com as plaquetas e os mastócitos, mencionados acima, os neutrófilos desempenham um papel fundamental pois matam agentes invasores diretamente através de substâncias antimicrobianas, proteases e peroxidases. Outra forma que os neutrófilos usam para eliminar agentes é a formação de NET (neutrophil extracellular traps) que é uma estrutura extracelular em forma de teia que é formada quando os neutrófilos expõem ADN genómico impregnado com substâncias antimicrobianas (Seeley *et al.*, 2012). A formação desta teia é um fenómeno de morte celular dos neutrófilos mas diferente de apoptose e de necrose. A NET serve para aprisionar micro-organismos no local da infecção e também para impedir a propagação das suas proteínas citotóxicas. A sua formação está grandemente dependente da expressão de TLR4 em plaquetas pois foi observado que quando ocorre deleção do TLR4 plaquetário, a formação de NET é fortemente reduzida. Tal como exemplos de sistemas de defesa anteriores, este sistema também é benéfico em infeções localizadas mas é prejudicial em infeções sistémicas pois pode provocar trombose microvascular e lesões pulmonares.

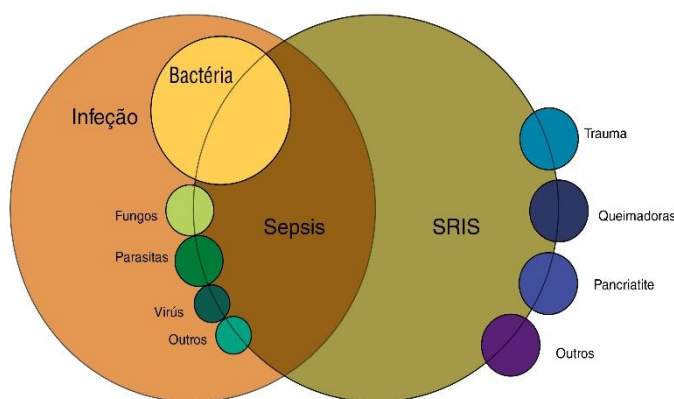
Em contraste com a forte resposta pró-inflamatória, numa fase mais tardia ocorre a fase de imunossupressão através da libertação de citoquinas anti-inflamatórias como por exemplo a IL-10. Um dos fenómenos que mais contribui para a imunossupressão nesta fase de sepsis é a apoptose de células do sistema imunitário das quais os exemplos mais relevantes são os linfócitos e as células dendríticas que constituem um dos grupos celulares mais importantes na apresentação de antigénios. Isto contribui para que o sistema imunitário fique fragilizado o que leva a uma maior probabilidade de infeção.

Como referido acima, durante esta condição, ocorrem alterações na micro e macrocirculação pois ocorre vasodilatação e depleção do volume intravascular. Estas alterações afetam o correto enchimento do coração o que diminui o seu output. Por

consequência, vai haver menos transporte de oxigênio por parte do sangue para os tecidos conduzindo a uma hipoxia. As mitocôndrias são os componentes que mais utilizam oxigênio para produzir ATP que é usado como energia pelo organismo. Ao ocorrer dano nas mitocôndrias no processo inflamatório vai ocorrer uma menor produção de ATP originando um balanço negativo de energia. De maneira a minimizar os efeitos negativos o organismo começa a “desligar” a maioria dos processos celulares ficando só o estritamente necessário que aliado à falta de irrigação dos órgãos, leva a uma espécie de animação suspensa que leva à disfunção do órgão (Rudiger *et al.*, 2008).

### 2.2.1- Diferença entre SIRS e Sepsis

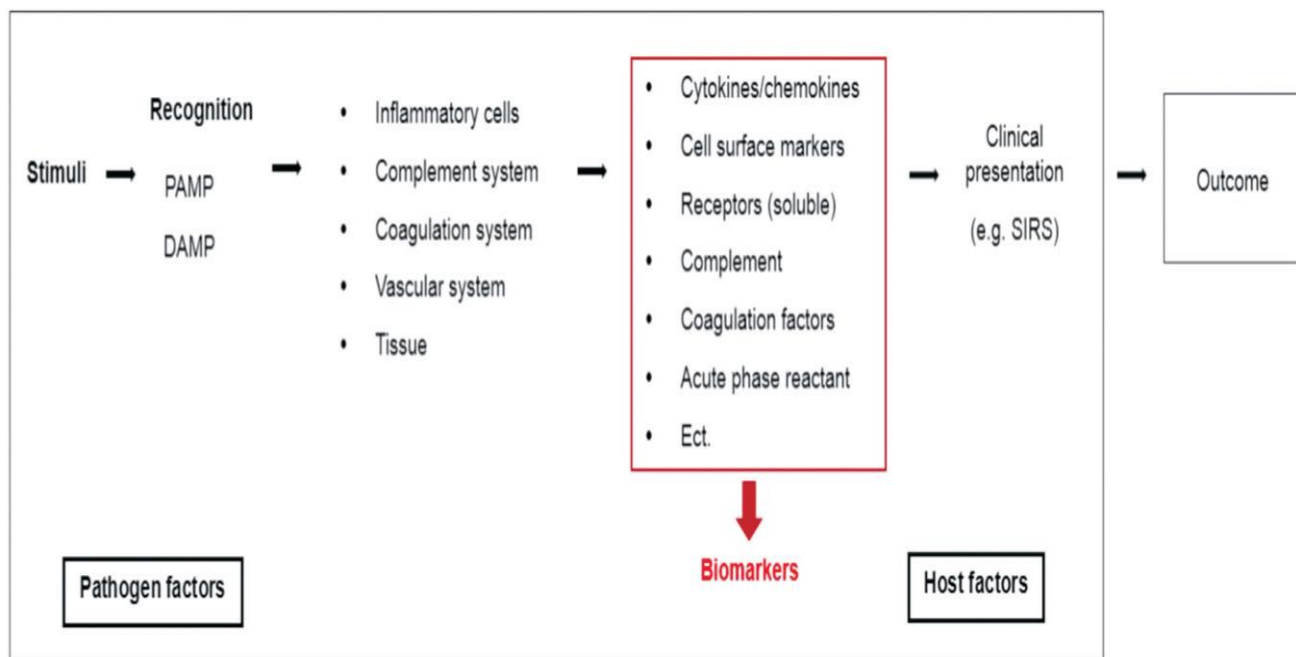
Tal como já foi referido acima, a SIRS é uma síndrome de resposta inflamatória sistémica. Nesta síndrome, não existe infeção por parte de um agente patogénico sendo uma inflamação sistémica asséptica. Já no caso da Sepsis, existe igualmente uma inflamação sistémica tal como na SIRS mas com a existência de uma infeção. Desta forma, o fator diferenciador entre estes dois quadros é a infeção (Figura 6).



**Figura 6:** Diferença entre sepsis e SIRS. Adaptado de Davies e Hagen, 1997.

## 2.3- Biomarcadores

Biomarcadores são entidades objetivamente medidas e avaliadas como um indicador de processos biológicos normais, processos patológicos ou resposta farmacológicas a uma determinada terapêutica (Strimbu e Tavel, 2010) (Figura 7).



**Figura 7:** Respostas sistêmicas em sepsis e possíveis biomarcadores. Adaptado de Cho e Choi, 2014.

Até hoje os biomarcadores foram agrupados em 4 grupos distintos; Biomarcadores de diagnóstico, de monitorização, estratificação e de substituição. Os biomarcadores de diagnóstico servem para determinar a presença ou ausência de doença. Biomarcadores de monitorização são moléculas que sofrem alteração no decurso da doença permitindo, assim, aos médicos fazer uma correta avaliação da sua evolução e efetividade terapêutica. Biomarcadores de estratificação são usados para permitir separar pacientes por classes de severidade permitindo modular o esquema terapêutico. Já os de substituição servem para prever a resolução da doença (Standage e Wong, 2011).

### 2.3.1- Proteína C-Reativa (*C-Reactive Protein- CRP*)

A proteína c-reativa, é uma proteína de fase aguda produzida pelo fígado, regulada pela IL-6, após inflamação ou danificação tecidual. A sua semivida no plasma é de 19 horas tanto o indivíduo se encontre saudável ou doente. A concentração média é de 0,8 mg/L, sendo que quando ocorrem estímulos inflamatórios os seus valores vão até aos 500 mg/L. A síntese hepática começa rapidamente após o estímulo subindo os valores de concentração em 5 mg/L em cerca de 6 horas. O pico é atingido às 48 horas. Quando o estímulo cessa, as concentrações são rapidamente reduzidas a uma velocidade semelhante ao rácio de clearance de CRP plasmática. A CRP consegue reconhecer e aderir a patógenos e a células danificadas estimulando a sua eliminação por interações com células e mediadores inflamatórios (Pepys e Hirshfield, 2003).

É um marcador clínico usado para o estudo da presença ou ausência de infeção e sepsis. Também tem sido usado para diferenciar pacientes com pneumonia de pacientes com infeções endotraqueais e para diagnóstico de apendicite e diferenciação de infeções bacterianas de víricas (Reinhart *et al.*, 2012).

Póvoa *et al*, 2011, realizaram um estudo em que, num período de 12 meses, observaram adultos com sepsis. Foram seguidos durante os primeiros 5 dias na UCI. Este estudo concluiu que a medição diária dos níveis de CRP a seguir à prescrição de antibióticos é útil a partir do terceiro dia para obter a previsão da resolução da doença. Este estudo também observou que níveis decrescentes de CRP nos primeiros 5 dias estava associado a melhor prognóstico (Póvoa *et al.*, 2011).

Um outro estudo também realizado por Póvoa *et al*, 2005, observou o poder diagnóstico da CRP, da temperatura corporal e do número de células brancas no diagnóstico de infeção em pacientes em estado crítico. Estes parâmetros foram medidos diariamente numa população de 76 pacientes infetados e 36 pacientes não infetados. Concentrações de CRP superiores a 8,7 mg/dl foram relacionadas com infeção apresentando valores de 93,4% de sensibilidade e 86,1% de especificidade. A combinação dos valores de CRP e de temperatura corporal subiram a especificidade do diagnóstico de infeção para 100%. (Póvoa *et al.*, 2005).

Já Sierra *et al*, 2004, observaram 125 pacientes com SIRS, sendo que 55 não apresentavam sinais de infeção e 70 diagnosticados com sepsis. Como controlo, foram

usados 25 pacientes com enfartes agudos do miocárdio não complicados e 50 indivíduos saudáveis. Dessa forma, foram criados 4 grupos consistindo o grupo 1 e 2 de indivíduos com SIRS, estando no grupo 1 indivíduos com infecção e no grupo 2 sem infecção. Já os grupos 3 e 4 pertenciam ao controle, sendo o grupo 3 representando por pacientes com infecção não sistêmica e o grupo 4 representado por indivíduos saudáveis.

O grupo composto por indivíduos saudáveis, apresentou os menores valores de CRP na ordem de 0,21 mg/dl. O grupo de pacientes com enfarte agudo do miocárdio, apresentaram valores de 2,2 mg/dl. O grupo dos pacientes com sepsis apresentou os valores mais altos de CRP na ordem de 18,9 mg/dl superando o grupo com SIRS sem infecção com valores de 1,7 mg/dl (Sierra *et al.*, 2004).

A partir destes dados, é possível concluir que a medição dos níveis de CRP apresentam-se elevados diferenciando pacientes sem infecção de pacientes com infecção dentro de um curto período de tempo.

Apesar da sua ampla utilização apresenta uma grande desvantagem que é a sua baixa especificidade como biomarcador de sepsis no indivíduo adulto. Por sua vez em crianças, apresenta bons resultados sendo muito usado para o diagnóstico inicial de sepsis nas primeiras 24 horas de vida, onde a sua sensibilidade está compreendida entre 29 e 100%, que é considerado um valor muito alto (Hofer *et al.*, 2012). Também é muito usado para monitorizar os pacientes após cirurgia onde os níveis costumam estar elevados comparativamente a níveis pré-operatórios mas que caem rapidamente excetuando-se o caso de infecção pós-operatória presente.

### 2.3.2- Procalcitonina (PCT)

A procalcitonina é um precursor da hormona calcitonina e é sintetizada por células C da tiroide, por macrófagos, células do fígado e do pulmão.. Tendo os seus níveis séricos normalmente baixos, em caso de resposta inflamatória estes sobem consideravelmente. As infeções bacterianas aparentam ser as que causam as maiores subidas dos seus níveis. Também existem provas de que os seus picos são maiores em infeções por bactérias do tipo gram-negativas. Em infeções bacterianas os níveis séricos de procalcitonina começam a subir 4 horas após o início da infeção e atingem o seu pico entres as 8 e as 24 horas (Kibe *et al.*, 2011). Apresenta uma semivida de 25 a 30 horas (Maruna *et al.*, 2000). Em pacientes que foram sujeitos a cirurgia, os níveis aumentam retornando ao normal 12 a 24 horas após a cirurgia em caso de não haver infeção ao contrário da CRP que se mantém elevada um maior número de dias após cirurgia (Kibe *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, a procalcitonina tem sido estudada como marcador para a distinção entre SIRS e sepsis. Foi concluído que pode ser usada como um adjuvante no diagnóstico em junção com outras técnicas mas que isoladamente não apresenta grande significado. É mais utilizada para descartar uma infeção caso os seus níveis sejam baixos já que quando estes são altos, pode ou não haver infeção (Kibe *et al.*, 2011).

Balci *et al*, 2003, realizaram um estudo envolvendo 33 pacientes da unidade intensiva. Os pacientes foram diagnosticados com SIRS, sepsis e choque séptico. Neste estudo são comparados os níveis séricos de procalcitonina com CRP, TNF, IL-2, IL-6 e IL-8 de forma a determinar qual marcador apresenta melhor especificidade e sensibilidade na diferenciação de SIRS e sepsis.

Após minuciosa análise, ficou provado que a procalcitonina apresenta uma maior sensibilidade e especificidade (85% e 91% respetivamente) do que todos os outros parâmetros estudados (Balci *et al.*, 2003) (Tabela 1).

	<b>CRP</b>	<b>TNF</b>	<b>IL-2</b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-8</b>	<b>PCT</b>
<b>SENSIBILIDADE</b>	58%	55%	63%	51%	68%	85%
<b>ESPECIFICIDADE</b>	58%	66%	55%	53%	57%	91%

**Tabela 1** Sensibilidade e especificidade de Marcadores. Adaptado de Balci *et al.*, 2003

Um outro estudo realizado por Guven *et al*, 2002, analisou os valores de PCT, CRP e de contagem de glóbulos brancos em pacientes com pelo menos dois critérios dos acima referidos para a SIRS. Foram inseridos neste estudo, 34 pacientes com sinais de SIRS que posteriormente foram divididos em dois grupos.

O primeiro grupo era composto por pacientes onde não havia suspeita de sepsis tendo apenas infecções menores como, por exemplo, do trato respiratório. Este grupo serviu de grupo controlo. O segundo grupo era composto por indivíduos com suspeita de sepsis.

Foi possível concluir que o grupo com suspeita de sepsis apresentou valores maiores de PCT do que o grupo sem suspeitas de sepsis. O resultado para sepsis era considerado positivo quando pacientes com infecção bacteriana documentada apresentavam valores de PCT superiores a 2 µg/L, níveis de CRP superiores a 5 mg/L e contagem de glóbulos brancos inferior a 4000 ou superior a 12000 células/mm (Guven *et al.*, 2002). A sensibilidade e especificidade de cada parâmetro para esses valores estão na tabela 2.

	<b>CRP</b>	<b>PCR</b>	<b>GB</b>
SENSIBILIDADE	78,9%	68,42%	47,4%
ESPECIFICIDADE	100%	0	46,7%

**Tabela 2** Sensibilidade e especificidade de CRP, PCR e GB. Adaptado de Guven *et al.*, 2002

A partir destes valores conclui-se que a PCT apresenta melhor sensibilidade e especificidade dos que os outros dois parâmetros no diagnóstico de sepsis.

A PCT não tem sido apenas estudada para o uso diagnóstico como referido acima. Alguns estudos como por exemplo um estudo realizado por Giamarellos-Bourboulis *et al*, 2002, demonstrou que a PCT também tem um valor elevado no prognóstico de doentes com sepsis. Segundo esse estudo, quanto mais elevados estavam os níveis séricos, pior o prognóstico sendo maior a probabilidade de mortalidade (Giamarellos-Bourboulis *et al.*, 2002).

Outra função que tem sido analisada em vários estudos é a sua medição para decisão de terapia antibiótica, pois quando os níveis descem para valores aceitáveis, os antibióticos podem ser suspensos sem aumentarem a mortalidade. (Reinhart *et al.*, 2012).

### **Limitações**

Existem limitações no uso de PCT como acima descrito pois ocorrem frequentemente elevações dos níveis séricos por motivos não específicos como por exemplo em situação de extremo stress (por exemplo, trauma severo, cirurgia ou ataque cardíaco). Por este motivo, a PCT discrimina melhor a presença ou ausência de infecção em pacientes não sujeitos a cirurgia. Algumas doenças autoimunes como por exemplo a doença de Kawasaki e vasculite também estão associados a níveis elevados. Já em sepsis originado por *Cândida*, os níveis de PCT são reduzidos ou mesmo normais sendo o seu uso como biomarcador em sepsis fúngica desaconselhado. Nestes casos, utilizam-se componentes da parede celular dos fungos como por exemplo o 1,3-B-glucano como marcadores (Reinhart *et al.*, 2012).

### **Toxicidade da procalcitonina na sepsis**

Muitos estudos até agora conseguiram concluir que a PCT tem efeitos agressivos nos indivíduos com quadro de sepsis. Estes estudos foram realizados com base em descobertas que o metabolismo da PCT em hamsters era semelhante ao dos humanos. A partir desta premissa, foi realizado um modelo virulento de peritonite introduzindo no peritónio placas de agar contendo *E. Coli*. Os níveis séricos de PCT e a mortalidade de 72 horas corresponderam à dose bacteriana administrada. Seguidamente, a dose foi ajustada para atingir uma mortalidade de 50%. A PCT que anteriormente tinha sido administrada a animais saudáveis e não tinha provocado efeitos tóxicos foi administrada a animais com sepsis que resultou numa mortalidade de aproximadamente 100% (Nylén *et al.*, 1998). Este valor demonstra a capacidade tóxica desta pré-hormona num já instalado quadro de sepsis, o que leva muitos investigadores a ponderar o efeito terapêutico da sua neutralização.

Para atingir esse objetivo de neutralização foi criado um antissoro a partir de uma cabra, específico para a porção média da PCT e foi administrada em hamsters com sepsis aumentando marcadamente a sobrevivência quer a neutralização fosse realizada num estágio inicial ou final (Nylén *et al*, 1998).

À luz destes resultados, foi realizado outro estudo mas desta vez em porcos com um modelo de sepsis bastante forte tentando atingir mortalidade rapidamente. Neste estudo, os autores tentaram observar se ao mudarem a especificidade do local do antissoro iriam conseguir os mesmos objetivos e para isso sintetizaram um antissoro em coelhos com especificidade para a porção amino-terminal da pré-hormona. Depois de já instalado o quadro grave de sepsis foi então administrado o antissoro que diminuiu a mortalidade a curto prazo quer no início ou no fim.

Os dados retirados são bastantes promissores no que toca à neutralização da PCT para fins terapêuticos melhorando a taxa de sobrevivência mesmo em doentes que já apresentam um estágio evoluído da doença (Wagner *et al*, 2002).

Apesar da sua toxicidade, a PCT é um dos biomarcadores mais estudados mais promissores na ajuda no diagnóstico e prognóstico do quadro séptico.

### **2.3.3- Proteína de ligação a lipopolissacarídeos (*Lipopolysaccharide Binding Protein- LBP*)**

A proteína de ligação a lipopolissacarídeos é uma proteína de fase aguda produzida maioritariamente por hepatócitos. A sua indução ocorre cerca de 12 horas após o estímulo quer por parte de bactérias gram-negativas quer por parte de bactérias gram-positivas (Orlikowsky *et al.*, 2006). A semivida no soro é de 12 a 24 horas (Behrendt *et al.*, 2004). Nos humanos, a proteína de ligação a lipopolissacarídeos costuma encontrar-se numa concentração sérica de 5 a 10 microgramas por mililitro mas esses níveis aumentam durante a fase aguda da reação atingindo picos de 200 microgramas por mililitro (Reinhart *et al.*, 2012).

A proteína de ligação a lipopolissacarídeos liga-se aos lipopolissacarídeos das bactérias Gram-negativas formando um complexo de ligação. Por sua vez, esse complexo liga-se ao CD14 e a recetores toll like originando uma transcrição de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios (Bloos e Reinhart, 2014).

Alguns estudos, concluíram que esta proteína podia ser usada como um marcador de infeção e um marcador de severidade e prognóstico. Apesar disso, um estudo mais recente demonstrou que a discriminação de pacientes sem infeção de pacientes com sepsis severa foi de eficácia moderada e que falhou em discriminação de pacientes com sepsis sem disfunção orgânica (Reinhart *et al.*, 2012).

Devido ao facto de haver mais associações entre níveis elevados de proteína de ligação a lipopolissacarídeos e infeções por parte de bactérias gram-negativas, Blairon *et al.*, 2014 conduziram um estudo em pacientes com sepsis severa e choque séptico avaliando a correlação entre os níveis de LBP e infeções por parte de bactérias gram-positivas e fungos. A conclusão foi que os níveis de LBP eram sensivelmente semelhantes quer em infeções por parte de bactérias gram-negativas quer por infeções por parte de bactérias gram-positivas e fungos. Também foi concluído que episódios posteriores de sepsis severa ou choque séptico no mesmo individuo apresentam valores menores de LBP. À luz destes resultados, percebe-se que a proteína de ligação a lipopolissacarídeos não é uma boa ferramenta para diagnosticar o microrganismo responsável pela infeção (Blairon *et al.*, 2014).

Villar *et al*, 2009, mediram as concentrações sérias de LBP no dia de admissão, após 48 horas e após 7 dias, de 180 pacientes com sepsis severa. O intuito deste estudo, é observar o poder prognóstico da LBP.

No dia de admissão, os níveis de LBP entre o grupo de sobreviventes e não sobreviventes foi semelhante (117,4 µg/ml nos sobreviventes e 129,8 µg/ml nos não sobreviventes). Já na medição realizada nas 48 horas após admissão, os níveis de LBP eram superiores no grupo dos não sobreviventes do que no grupo dos sobreviventes (77,2 µg/ml nos sobreviventes e 121,2 µg/ml nos não sobreviventes). Por fim, no dia 7, os níveis também se encontravam ligeiramente superiores no grupo dos não sobreviventes (64,7 µg/ml nos sobreviventes e 89,7 µg/ml nos não sobreviventes) (Villar *et al*, 2009). Estes resultados provam que a partir das 48 horas os níveis de LBP são bons indicadores de severidade e mortalidade.

### 2.3.4- Pentraxinas

Pentraxinas são uma superfamília de proteínas envolvidas em respostas de fase aguda que atuam como recetores de reconhecimento padrão. A proteína c-reativa é uma pentraxina curta, e como as pentraxinas curtas, as pentraxinas longas como, por exemplo, a pentraxina 3 são secretadas por várias células (Reinhart *et al.*, 2012). A sua síntese é estimulada por citocinas e endotoxinas. A concentração normal no plasma é de 2 ng/ml. Em condições inflamatórias, os seus níveis sobem rapidamente atingindo concentrações compreendidas entre 200 e 800 ng/ml em 6 a 8 horas (Bastrup-Birk *et al.*, 2013). Ligam-se especificamente a fungos, bactérias e vírus induzindo fagocitose por ligação ao fator de complemento C1q. Em pacientes com sepsis severa e choque séptico, níveis persistentes altos de pentraxina 3 nos primeiros dias foram associados com mortalidade.

Um estudo realizado por Bastrup-Birk *et al.*, 2013 avaliou os níveis de pentraxina 3 em 261 pacientes com SIRS, usando como controlo 100 amostras sanguíneas de dadores de forma a observar a capacidade de biomarcador que a pentraxina apresenta no diagnóstico de SIRS, sepsis, sepsis severa e choque séptico. Como já era de esperar, os níveis de pentraxina 3 nos pacientes (média de 71,3 ng/ml) foram superiores aos do controlo (0 ng/ml). Estes níveis de pentraxina 3 apresentaram uma sensibilidade de 89,1% e uma especificidade de 85,0% para a discriminação entre pacientes e controlo. Níveis superiores de pentraxina 3 foram associados a sepsis, sepsis severa e choque séptico (Bastrup-Birk *et al.*, 2013). Também foi possível concluir que pacientes que apresentavam maiores níveis no dia de admissão, obtiveram uma maior mortalidade ao fim de 90 dias do que o restante grupo.

Num estudo realizado por Uusitalo-Seppälä *et al.*, 2013, 537 pacientes foram divididos em 5 grupos. O grupo 1 consistia em pacientes sem SIRS e sem infeção bacteriana; o grupo 2 era constituído por pacientes com infeção mas sem SIRS; o grupo 3 tinha SIRS mas não apresentava infeção; o grupo 4 tinha sepsis (ou seja infeção e SIRS) mas sem falência orgânica; e o grupo 5 apresentava sepsis severa. Foram feitas medições dos níveis de pentraxina 3 e os níveis médios foram de 2,6 ng/ml para o grupo 1, 4,4 ng/ml para o grupo 2, 5,0 ng/ml para o grupo 3, 6,1 ng/ml para o grupo 4 e 16,7 ng/ml para o grupo 5. Já os não sobreviventes apresentaram uma média de 14,1 ng/ml contra uns 5,1 ng/ml por parte dos sobreviventes (Uusitalo-Seppälä *et al.*, 2013). Estes dados permitem concluir que aquando da admissão dos pacientes no hospital, a medição dos

## Marcadores Bioquímicos de Sepsis

níveis de pentraxina 3 são úteis para prever sepsis severa e mortalidade pois nos pacientes com sepsis severa e nos não sobreviventes os níveis foram muito superiores.

Os estudos referidos acima permitem concluir que a pentraxina 3 é um bom biomarcador de prognóstico fornecendo dados importantes sobre como tratar determinado paciente dependendo dos valores dos níveis séricos.

### **2.3.5- Fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor- TNF*) e interleucina-1 (IL-1)**

Citocinas são pequenas proteínas mediadoras do sistema imunitário. Quando são libertadas, as citocinas pró-inflamatórias levam a uma ativação do sistema imunológico nato e adaptativo que vai aumentar ainda mais a produção de citocinas. Esta crescente libertação é designada por cascata de citocinas (Shulte *et al.*, 2013).

Dentro das citocinas pró-inflamatórias mais estudadas estão o TNF e a IL-1 que inclui interleucina 1 alfa e interleucina 1 beta.

O TNF não deriva apenas de células imunes ativadas como por exemplo os macrófagos mas também por células não imunes como por exemplo os fibroblastos em resposta a um estímulo inflamatório. Após esse estímulo, a produção do fator de necrose tumoral começa passado cerca de 30 minutos (Shulte *et al.*, 2013). Apresenta uma semivida de 17 minutos (Cho e Choi, 2014). O fator atua por via de recetores transmembranares específicos levando à ativação de células imunes que, por sua vez, vão libertar mais mediadores imunitários.

O TNF tem um papel muito importante na sepsis devido aos seus mecanismos de ação. Quando é libertado, atua em células como macrófagos, aumentando a sua produção por células progenitoras, promove ativação e diferenciação e aumenta a sua sobrevivência. Estes mecanismos descritos aumentam consideravelmente a resposta inflamatória. Também aumentam a capacidade de adesão das integrinas em neutrófilos promovendo a sua movimentação entre tecidos. Outro mecanismo potenciador é a sua capacidade de ativar a coagulação. Devido ao seu papel ativador de macrófagos referido acima, vai fazer com que estes secretem mais citocinas, mediadores lipídicos e espécies reativas de oxigénio e nitrogénio que leva à indução de disfunção orgânica.

Waage e Espevik, 1987, analisaram amostras de 79 pacientes com meningite meningocócica e sepsis, ou ambos, de forma a medir os níveis de TNF em 10 de 11 pacientes que morreram e em 8 de 68 que sobreviveram. Desta forma foi possível concluir que o TNF apresenta correlação com severidade e mortalidade mostrando-se um bom marcador prognóstico (Waage e Espevik, 1987).

A IL-1 é libertada primeiramente por macrófagos ativados tendo efeitos semelhantes ao TNF no que toca à posterior libertação de mais mediadores. A infusão do TNF recombinante em humanos provocou SIRS e resultados semelhantes foram encontrados para a IL-1 sendo que os dois atuam sinergicamente para induzir um estado semelhante a choque caracterizado por permeabilidade vascular, edema pulmonar e hemorragias.

### 2.3.6- Interleucina-6

Uma citocina muito estudada é a interleucina-6. Esta interleucina é uma glicoproteína produzida por várias células do organismo como, por exemplo, macrófagos, fibroblastos e células dendríticas sobre o estímulo de TNF e IL-1 (Bloos e Reinhart, 2014). Os seus valores em indivíduos saudáveis são indetectáveis aumentando em situações de trauma, infeção ou algum tipo de stress. Esse aumento é realizado de forma rápida levando a uma cascata de eventos inflamatórios (Palmieri, Augsburger, 2014). O seu pico aparece duas horas após infeção e mantém-se durante muito mais tempo do que o fator de necrose tumoral e a IL-1 (Bloos e Reinhart, 2014). Os efeitos da IL-6 no organismo são a ativação de linfócitos B e T, ativação da coagulação e modulação da hematopoiese.

Harbarth *et al*, 2001, realizaram um estudo de forma a comparar a capacidade diagnóstica da PCT com a IL-6 e a IL-8. Foram usados 78 pacientes sendo que 18 apresentavam SIRS, 14 casos de sepsis, 21 casos de sepsis severa e 25 casos de choque séptico. De todos os marcadores, a PCT foi o marcador que melhor sensibilidade e especificidade apresentou para distinguir SIRS de sepsis (Harbarth *et al.*, 2001) (Tabela 3).

	<b>PCT</b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-8</b>
<b>SENSIBILIDADE</b>	97%	67%	63%
<b>ESPECIFICIDADE</b>	78%	72%	78%

**Tabela 3** Sensibilidade e especificidade de PCT, IL-6 e Il-8. Adaptado de Harbarth *et al.*, 2001

Apesar de não apresentar grande poder diagnóstico, apresenta poder prognóstico pois os seus níveis estão associados a mortalidade e severidade. Contudo, mesmo apresentando estas características de marcador prognóstico, tal como outros marcadores os seus níveis elevados podem ser causados por estímulos não infecciosos tal como trauma e cirurgia.

### 2.3.7- Interleucina-8 (IL-8)

A IL-8 é uma quimiocina produzida por várias células como monócitos, macrófagos e fibroblastos. Tem atividade quimiotática para linfócitos T, eosinófilos e basófilos. É capaz de estimular muitas atividades dos leucócitos polimorfonucleares como, por exemplo, a explosão oxidativa onde ocorre uma libertação de espécies reativas de oxigénio, exocitose de determinados grânulos, libertação de proteases e aumento de expressão de integrinas. Devido a todas estas funções no organismo, a IL-8 é uma importante citocina pró-inflamatória. Os seus níveis no sangue têm sido relacionados com a severidade da doença e o seu desfecho (Marie *et al.*, 1997).

Num estudo realizado por Hack *et al.*, 1992, foram comparados indivíduos saudáveis com pacientes com sepsis tendo em conta os seus níveis de IL-8. Nos voluntários saudáveis, os níveis estavam compreendidos entre os 6 e os 41  $\mu\text{g}$ . Já em indivíduos com sepsis os níveis variavam entre 7 e 66000  $\mu\text{g/ml}$ . Apesar desta diferença, esta citocina provou-se incapaz de diferenciar sepsis de síndrome inflamatório sem infeção. Também foi incapaz de discriminar infeções provocadas por bactérias gram-positivas de infeções provocadas por bactérias gram-negativas. Relativamente ao desenvolvimento de choque séptico, a IL-8 mostrou-se capaz de oferecer um bom prognóstico pois os pacientes foram divididos em 4 grupos e o grupo com maiores níveis de IL-8 apresentou maiores níveis de desenvolvimento de choque. Quanto ao seu poder prognóstico de mortalidade, os dados estatísticos não foram relevantes não oferecendo ferramentas prognósticas neste âmbito (Hack *et al.*, 1992).

Relativamente a sepsis neonatal, foi realizado um estudo conduzido por Boskabadi *et al.*, 2010, que observou 80 recém-nascidos sendo que 38 eram casos e 42 eram controlos. Os dados permitiram concluir que os níveis de IL-8 nos pacientes que se veio a provar terem culturas bacterianas positivas eram 34 vezes maiores do que nos indivíduos saudáveis o que tem levado à diminuição de uso de antibióticos em meio hospitalar. Quando associado a outro biomarcador como, por exemplo, CRP a sua capacidade diagnóstica melhora significativamente. Também foi possível perceber o poder prognóstico da IL-8 pois em recém-nascidos que não sobreviveram os níveis foram cerca de 3,3 vezes superiores do que os sobreviventes (Boskabadi *et al.*, 2010).

## Marcadores Bioquímicos de Sepsis

Em resumo, esta citocina não é um marcador diagnóstico de eleição pois não apresenta grande capacidade de diferenciar SIRS de sepsis e o seu uso como marcador prognóstico de mortalidade também não apresenta grandes vantagens. Já como marcador de prognóstico de severidade apresentou algumas aplicações conseguindo prever desenvolvimento de choque.

### **2.3.8- Interleucina-12**

A interleucina-12 é estruturalmente relacionada com a família das interleucina-6. Esta citocina é produzida maioritariamente por fagócitos como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Regula o sistema imunitário induzindo a produção de interferão- $\gamma$  por células T e natural killers, que por sua vez ativam os macrófagos que vão aumentar a produção de citocinas. A IL-12 também apresenta capacidade de aumentar a proliferação e criação de colónias de progenitores hematopoiéticos (Schulte *et al.*, 2013).

Contudo, o seu papel na sepsis continua controverso. Depois de alguns estudos chegou-se à conclusão que níveis elevados de IL-12 estão relacionados com um aumento da sobrevivência ao contrário de níveis baixos que estão relacionados com mortalidade.

Um desses estudos foi realizado por Mancuso *et al.*, 1997, onde foi observado o papel desta citocina em sepsis neonatal provocada por estreptococos do grupo B. Em animais onde foi administrado um composto anti-IL-12 houve um aumento da mortalidade e em animais administrados com IL-12 recombinante houve uma redução da mortalidade (Mancuso *et al.*, 1997).

### **2.3.9- Fator de inibição de migração de macrófagos (*Macrophage Migration Inhibitory Factor- MIF*)**

O fator de inibição de migração de macrófagos é uma citocina pró-inflamatória produzida por vários tipos de células desde monócitos, macrófagos, células endócrinas e endoteliais, em resposta a estímulos inflamatórios (Grieb *et al.*, 2010). Esta citocina aumenta as respostas antimicrobianas dos macrófagos, devido à sua capacidade de aumentar a sua sobrevivência, aumentando a expressão de TLR4. Também aumenta o seu recrutamento. Estimula a produção de outras citocinas como, por exemplo, o TNF, interferão- $\gamma$  e IL-1, ativando também células T. Em condições normais, os seus níveis estão entre os 2 e 10 ng/mL. As concentrações costumam estar elevadas durante infeções (Cho, Choi, 2014).

A primeira prova do papel do fator de inibição na sepsis foi dada por Calandra *et al.*, 2000, que demonstrou que os níveis eram bastante elevados em pacientes com sepsis e ainda mais elevados em pacientes com choque séptico (Calandra *et al.*, 2000). Contudo, não apresenta bom poder de diferenciação de doentes sem infeção para doentes com infeção tal como provou Lehmann *et al.*, 2001, num estudo que realizou envolvendo pacientes com sepsis e pacientes em estado crítico pós-operatório. Os seus níveis eram muito maiores nestes dois grupos do que no grupo controlo saudável. Apesar disso, entre eles, não apresentavam diferenças significativas (Lehmann *et al.*, 2001).

Bozza *et al.*, 2004, observaram 42 pacientes medindo os níveis de fator de migração e chegaram à conclusão que este marcador apresenta boas características prognósticas de severidade e mortalidade (Bozza *et al.*, 2004).

Embora possua fraco poder diagnóstico, vários investigadores afirmam possuir bom poder prognóstico prevendo estados com pior resolução.

### **2.3.10- Interleucina-10 (IL-10)**

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória produzida por várias células do sistema imune como, por exemplo, monócitos, macrófagos e linfócitos B e T. Ficou provado em estudos *in vitro* que a IL-10 tem um poder de supressão sobre citocinas pró-inflamatórias como por exemplo o TNF e a IL-1 diminuindo as suas concentrações e conseqüentemente os seus efeitos inflamatórios. Em estudos realizados em modelos de murinos, a administração de IL-10 protegia os ratos de uma endotoxemia letal e a sua imunoneutralização revertia este processo (Shulte *et al.*, 2013). Também foi observado que em estados mais avançados, a administração de IL-10 piorava o quadro sendo que o efeito benéfico desta citocina está muito depende da altura em que é administrada.

Inibe as citocinas pró-inflamatórias das células Th1, incluindo o interferon e o TNF (Chuang *et al.*, 2013).

Num estudo realizado por Chuang *et al.*, 2013, foram medidos os níveis séricos do fator de inibição de migração de macrófagos e de IL-10 em 153 pacientes com choque séptico. Embora teoricamente no modelo de sepsis fosse considerado que primeiro ocorria uma fase pró-inflamatória e mais tarde anti-inflamatória, este estudo demonstrou que os níveis dos dois tipos de citocinas são elevados simultaneamente no início. Também foi possível concluir que a IL-10 é um bom biomarcador de prognóstico conseguindo prever mortalidade na altura de admissão, 48 horas, 72 horas e até 15 dias (Chuang *et al.*, 2013).

Andaluz-Ojeda *et al.*, 2012, realizou um estudo onde chegou à conclusão que níveis de IL-10 eram mais elevados em pacientes no primeiro dia de sepsis severa ou choque séptico, estando esses níveis correlacionados com uma maior mortalidade (Andaluz-Ojeda *et al.*, 2012).

### **2.3.11- High-mobility-group box 1- HMGB1**

A HMGB1 é uma proteína nuclear e citoplasmática mediadora de inflamação com propriedades de fator de transcrição e de crescimento. A sua produção é estimulada por TNF e IL-1 (Park *et al*, 2005). Tem um papel importante na estimulação que exerce sobre os macrófagos e monócitos para a libertação de citocinas. É libertada por macrófagos ativados mas a sua concentração demora mais a aumentar do que, por exemplo, o fator de necrose tumoral e a IL-1. Os seus níveis demoram cerca de 8 a 12 horas a atingir valores detetáveis (Cho e Choi., 2014). Em indivíduos saudáveis, esta proteína não é detetável.

Num estudo realizado por Gaïni *et al.*, 2007 foram medidos os níveis de HMGB1 em pacientes com sepsis, sepsis severa, pacientes infetados sem apresentar SIRS e pacientes sem infeção. Para além destes grupos ainda existia um grupo controlo composto por indivíduos saudáveis. Foi possível concluir que os níveis foram substancialmente mais elevados nos pacientes do que no grupo controlo. No entanto, entre os pacientes, não houve significância estatística entre os restantes grupos não sendo este biomarcador capaz de diferenciar situações de infeção ou não (Gaïni *et al*, 2007).

Hou *et al.*, 2009, realizaram um estudo em ratos de forma a estudar os efeitos do HMGB-1 na severidade do quadro séptico. Para esse efeito, foram inoculadas 3 doses de lipossacarídeos em grupos diferentes (4,8, e 16 mg/kg). O grupo de controlo, foi inoculado com o veículo apenas. Os níveis de HMGB-1 subiram entre 8 a 32 horas, chegando ao pico cerca de 24 horas depois da inoculação, sendo superiores nos grupos inoculados do que no grupo controlo. Dentro dos grupos inoculados, o grupo com maior dose de lipossacarídeos apresentou maiores níveis de HMGB-1. Foi também concluído que o HMGB-1 está relacionado com severidade (Hou *et al.*, 2009).

### **2.3.12- Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 – sTREM-1**

O TREM-1 é um membro da superfamília das imunoglobulinas que é produzido em maior quantidade em células mieloides como, por exemplo, fagócitos na presença de bactérias ou fungos. A sua expressão é regulada por fluidos biológicos humanos e por tecidos infetados com bactérias gram-positivo e gram-negativo (Palmiere e Augsburg, 2014). Os fagócitos ativados libertam uma forma solúvel (sTREM-1) que aparece no plasma. Em situações onde não existe infeção os níveis de sTREM-1 mantêm-se baixos.

Num estudo realizado por Zhang *et al.*, 2011, foi comparado o poder diagnóstico e prognóstico do sTREM-1 relativamente à CRP e à PCT. Foram observados 52 pacientes sendo que 15 apresentavam sepsis e 37 apresentavam sepsis severa. Os níveis dos 3 biomarcadores foram medidos nos dias 1,3,5,7,10 e 14 após admissão. Conclui-se então que os níveis de sTREM-1 em indivíduos com sepsis severa era superior aos indivíduos com sepsis no primeiro dia e que os níveis dos outros dois biomarcadores não apresentavam grandes diferenças entre os dois grupos. Relativamente à capacidade prognóstica, o grupo dos não sobreviventes apresentava valores superiores de sTREM-1 relativamente ao grupo dos sobreviventes em todos os pontos temporais. Por sua vez os valores de CRP e de PCT foram sempre descendo ao longo do tempo em ambos os grupos. Deste estudo tira-se a conclusão que o sTREM-1 apresenta melhor poder de diagnóstico e prognóstico do que os outros biomarcadores estudados (Zhang *et al.*, 2011).

Já num estudo realizado por Wu *et al.*, 2012 foi observado que o sTREM-1 apresenta capacidade moderada para diferenciar sepsis de SIRS mas que isoladamente não apresentava grande capacidade diagnóstica (Wu *et al.*, 2012).

Su *et al.*, 2012, avaliaram também estes 3 marcadores (sTREM, PCT e CRP) de forma a analisar o seu poder diagnóstico em diferenciar SIRS de sepsis e o seu poder prognóstico de mortalidade e severidade. Foram usados 144 pacientes da unidade de cuidados intensivos, sendo que 60 apresentavam SIRS e 84 sepsis. De seguida, de acordo com os resultados da cultura sanguínea, foram divididos em 2 grupos: com cultura bacteriana positiva (33 pacientes) e com cultura bacteriana negativa (51 pacientes). Por fim, de acordo com a sobrevivência a 28 dias, todos os pacientes foram divididos entre sobreviventes e não sobreviventes (Su *et al.*, 2012).

No dia de admissão, os níveis de sTREM-1, PCT e CRP foram superiores no grupo de sepsis do que no grupo com SIRS. Os valores estão na tabela 4:

	<b>STREM-1</b>	<b>PCT</b>	<b>CRP</b>
SESPIS	149,06 µg/ml	11,4 mg/dl	2,86 ng/ml
SIRS	59,97 µg/ml	8,3 mg/dl	0,33 ng/ml

**Tabela 4** Valores em pacientes com sepsis e SIRS. Adaptado de Su *et al.*, 2012

Já os níveis de sensibilidade e especificidade para diagnóstico entre SIRS e sepsis foram os seguintes (Tabela 5):

	<b>STREM-1</b>	<b>PCT</b>	<b>CRP</b>
SENSIBILIDADE	83%	55%	35%
ESPECIFICIDADE	81%	83%	98%

**Tabela 5** Sensibilidade e especificidade de STREM, PCT e CRP. Adaptado de Su *et al.*, 2012

A partir destes dados podemos concluir que o sTREM apresenta a maior capacidade dos 3 para distinguir sepsis de SIRS sendo a sua sensibilidade bastante superior.

Relativamente à capacidade prognóstica destes marcadores, no grupo com cultura bacteriana negativa, os níveis não se diferenciaram muito entre sobreviventes e não sobreviventes. Já no grupo com cultura positiva, todos os marcadores apresentaram níveis mais elevados no grupo dos não sobreviventes mas apenas o sTREM e a procalcitonina foram significativamente diferentes sendo que apenas estes dois apresentam um bom poder prognóstico segundo este estudo.

Os valores de sensibilidade e especificidade destes dois marcadores para prognóstico de mortalidade foram (Tabela 6):

## Marcadores Bioquímicos de Sepsis

	<b>STREM-1</b>	<b>PCT</b>
SENSIBILIDADE	100%	90%
ESPECIFICIDADE	68%	63%

**Tabela 6** Sensibilidade e especificidade de STREM e PCT. Adaptado de Su *et al.*, 2012

### **2.3.13- Soluble urokinase plasminogen activator receptor- suPAR**

O uPAR é um recetor de sinalização de superfície expressado em vários leucócitos. Está envolvido em várias funções imunológicas tais como adesão celular, diferenciação, proliferação e migração. Na presença de um processo inflamatório o uPAR é clivado da superfície das células por parte de proteases na sua forma solúvel (suPAR). Os seus níveis costumam estar mais elevados em situações de presença bacteriana, viral, cancro, queimaduras ou doenças reumáticas. Pode ser medido a partir de vários fluidos como, por exemplo, urina, saliva e fluido de lavagem brônquica (Cho, Choi, 2014).

Em 2012 um estudo de revisão feito por Backes *et al.*, 2012, concluiu que o suPAR apesar de apresentar níveis elevados em sepsis e SIRS, não apresenta bom poder diagnóstico pois é um marcador não-específico de inflamação. No entanto, a nível prognóstico apresenta bons resultados estando a sua elevada quantidade associada a um pior prognóstico do paciente (Backes *et al.*, 2012).

Outro estudo de revisão publicado em 2012 por parte de Donadello *et al.*, 2012, obteve resultados semelhantes indicando a fraca capacidade diagnóstica e forte capacidade prognóstica deste marcador (Donadello *et al.*, 2012).

Um outro estudo realizado por Huttunen *et al.*, 2011, reforçou o estatuto de bom indicador prognóstico do suPAR. Neste estudo, foram recolhidas amostras de 132 pacientes com bacteriemia. Os valores foram medidos no dia 1 e 4, no dia 13 e 18 e depois da recuperação. Nos dias 1 e 4 os níveis de suPAR foram bastante superiores no grupo dos não sobreviventes (15,8 vs 7,3 ng/ml). Já a sua sensibilidade foi de 83% e a especificidade de 76% (Huttunen *et al.*, 2011).

Devido a estes dados é seguro concluir que o suPAR não é um bom biomarcador para diferenciação de sepsis e SIRS mas é um bom biomarcador para observação de severidade ajudando no esquema terapêutico.

### 2.3.14- CD64

CD64 é uma glicoproteína de membrana expressada por células polimorfonucleares com afinidade para a região Fc das IgG. A sua expressão está aumentada em casos de infecções bacterianas, normalmente ao final de algumas horas após a ativação do sistema imune inato. É regulada por citocinas inflamatórias como por exemplo a IL-12 e o INF- $\gamma$  (Davis *et al.*, 2006). Não é expressa por indivíduos saudáveis estando por isso a sua elevação relacionada com infecção (Cho, Choi, 2014).

Num estudo realizado por Icardi *et al.*, 2009, ficou demonstrado que a medição dos níveis de CD64 apresentam utilidade no diagnóstico de sepsis apresentando uma boa sensibilidade e especificidade (94,6% e 88,7% respetivamente) (Icardi *et al.*, 2009). Já num estudo realizado por Streimish *et al.*, 2012, onde se observou a capacidade do CD64 como marcador da sepsis neonatal ficou provado que este marcador tem a capacidade de prever culturas positivas no sangue e que ajuda na decisão de toma ou suspensão de antibióticos sendo por isso de extrema importância para o diagnóstico precoce (Streimish *et al.*, 2012).

Cortegiani *et al.*, 2010, também concluíram a utilidade do CD64 no diagnóstico realizando um estudo com 3 grupos diferentes. Um grupo com sepsis, outro com SIRS positiva e outro com SIRS negativa. Os resultados mostraram que os níveis de CD64 eram superiores nos indivíduos com sepsis do que nos outros dois grupos (Cortegiani *et al.*, 2010). Cardelli *et al.*, 2008, avaliaram 112 pacientes da unidade de cuidados intensivos com suspeitas de quadro séptico. Em 52 pacientes foi efetivamente provado esse quadro através de cultura de sangue positiva. O CD64 foi capaz de distinguir esses pacientes dos restantes com uma elevada especificidade e sensibilidade (95% e 96% respetivamente), sendo efetivamente mais específico que a procalcitonina (Cardelli *et al.*, 2008). Hsu *et al.*, 2011, mostraram que em pacientes em unidade de cuidados intensivos respiratórios, o CD64 era melhor que a procalcitonina para distinguir SIRS de sepsis severa e choque séptico (com uma sensibilidade de 89% e especificidade de 96%). Neste estudo, o CD64 também foi correlacionado com mortalidade (Hsu *et al.*, 2011).

A partir destes dados, pode-se concluir que o CD64 é um bom marcador tanto de diagnóstico como de prognóstico apesar de mais estudos serem requeridos.

### 2.3.15- Lactato

Níveis elevados de lactato costumam ocorrer quando ocorre hipoxia em tecidos. Está presente um quadro de acidose láctica quando o lactato se apresenta em concentrações iguais ou superiores a 45 mg/dl. Pacientes em estado crítico podem apresentar níveis de lactato na ordem de 18 mg/dl sendo considerados níveis normais apesar de os valores de referência serem de 10 mg/dl (Koliski *et al*, 2005). Em situações normais a nível celular, a produção de energia ocorre graças à glicose e ao oxigénio, havendo transformação de glicose em piruvato produzindo duas moléculas de ATP. Depois o piruvato entra no ciclo de Krebs produzindo mais ATP. No entanto, quando um tecido está em condições de hipoxia, o piruvato é transformado em lactato fazendo parte da metabolização anaeróbia. Quando isto acontece normalmente o fígado metaboliza o lactato a glicose sendo por isso fácil de concluir um quadro de disfunção hepática quando os níveis de lactato são bastante elevados (Cho e Choi, 2014). Devido a esta razão, é possível concluir através dos níveis de lactato a presença de choque séptico. Vários estudos relacionaram os níveis de lactato com mortalidade em sepsis. Num estudo realizado por Marty *et al.*, 2013, a clearance de lactato era mais elevada no grupo dos pacientes que sobreviveram do que no grupo dos não sobreviventes tendo sido portanto, concluído que a clearance de lactato oferece uma boa ferramenta de prognóstico de mortalidade em doentes com sepsis (Marty *et al.*, 2013).

Krishna *et al.*, 2009, chegaram à conclusão que níveis elevados de lactato estavam relacionados com mortalidade e que o tratamento direcionado para a redução desses níveis pode melhorar as hipóteses de sobrevivência (Krishna *et al.*, 2009).

Mikkelsen *et al*, 2009, analisaram 830 pacientes com sepsis severa e choque séptico no departamento de emergência. O objetivo foi de avaliar a relação entre níveis de lactato e mortalidade. Os pacientes foram depois divididos em dois grupos: um grupo sem presença de choque e um grupo com presença de choque. No grupo sem choque, a média de concentrações de lactato inicial estava muito aumentada nos não sobreviventes relativamente aos sobreviventes. Resultados semelhantes foram reportados no grupo que apresentava choque (Mikkelsen *et al*, 2009).

Jat *et al.*, 2011, fizeram descobertas semelhantes no seu estudo publicado em 2011 onde observaram que níveis de lactato elevados estavam associados com mortalidade (Jat *et al.*, 2011).

### 2.3.16- *Endothelial cell-specific molecule-1- Endocan*

Vários estudos têm relacionado a ativação das células do endotélio com sepsis. Dos vários efeitos que o endotélio regula durante a resposta séptica podemos referir, por exemplo, alterações no balanço homeostático, permeabilidade vascular, fluxo microcirculatório e inflamação. Por causa disso tem havido um aumento de interesse pelo estudo de biomarcadores do endotélio em casos de sepsis. Um desses biomarcadores é o endocan (endothelial cell-specific molecule-1) que é altamente expresso por células endoteliais e é bastante regulado por citocinas pró-inflamatórias (Palmiere e Augsburger, 2014). Em indivíduos saudáveis os seus níveis são baixos. Para além desse fator, os seus níveis em indivíduos com sepsis, choque séptico e sepsis severa são superiores aos indivíduos saudáveis e os seus níveis estão relacionados com severidade. Num estudo de Parmentier *et al.*, 2010, ficou provado que o endocan apresenta capacidade prognóstica pois os seus níveis elevados foram relacionados com mortalidade ao passo que os seus níveis mais reduzidos foram relacionados com uma maior taxa de sobrevivência (Parmentier *et al.*, 2010). Uma outra vantagem deste biomarcador é a facilidade da sua medição em fluidos orgânicos como por exemplo o sangue. Num outro estudo realizado por Lassalle *et al.*, 2012, resultados semelhantes foram encontrados sendo possível relacionar os níveis de endocan com severidade e mortalidade (Lassalle *et al.*, 2012).

Outro estudo com resultados semelhantes foi conduzido por Scherpereel *et al.*, 2006, onde níveis de endocan se encontravam superiores em indivíduos com sepsis do que em indivíduos com SIRS e em controlos saudáveis. Níveis de endocan também foram superiores em pacientes com choque séptico do que sepsis severa e sepsis (Scherpereel *et al.*, 2006).

Os níveis encontram-se na tabela 7:

	<b>SEPSIS</b>	<b>SIRS</b>	<b>CONTROLO</b>
<b>ENDOCAN</b>	2,71 ng/ml	0,77 ng/ml	0,68 ng/ml

**Tabela 7** Níveis de Endocan. Adaptado de Scherpereel *et al.*, 2006

A nível prognóstico, pacientes que não sobreviveram apresentaram maiores níveis de endocan do que os sobreviventes (6,98 vs 2,54 ng/ml), apresentando uma sensibilidade de 75% e uma especificidade de 84%.

### **2.3.17- Agentes patogénicos e seus derivados como biomarcadores**

A grande diferença entre sepsis e SIRS é que em quadro séptico existe a presença de um agente patogénico como, por exemplo, uma bactéria ou um fungo havendo portanto uma infeção. Desse modo, um marcador que seria ideal para a correta distinção entre estes dois quadros seria a deteção direta do agente agressor ou mesmo de algum dos seus componentes ou produtos. No entanto, as técnicas de análises de amostras de pacientes demoram cerca de 72 horas a apresentar o resultado sendo que é um tempo muito longo para fazer uma decisão terapêutica. Outro inconveniente destas técnicas é que apenas cerca de 30 % dos pacientes com sepsis é que apresentam cultura positiva (Bloos e Reinhart, 2014).

De forma a tentar contornar estes obstáculos, tem sido dada mais atenção ao PCR (polymerase chain reaction) onde teoricamente o tempo de espera para obter um resultado seria de 6 a 8 horas. Ficou provado em estudos que o PCR apresenta mais sensibilidade em relação aos testes normais pois os resultados positivos são cerca do dobro do que em análises clássicas. No entanto, ainda uma grande parte dos pacientes com sepsis continua a obter um resultado negativo e o tempo necessário para o resultado foi de cerca de 24 horas e não as 6 inicialmente estipuladas (Bloos e Reinhart, 2014).

Shang *et al.*, 2005, realizaram um estudo onde colheram amostras de 172 pacientes com possível septicemia utilizando o teste de cultura de sangue e PCR para deteção de possíveis microrganismos. Dos 172 casos, 17 deram positivo no PCR que apresentou um número de positivos superior ao da cultura de sangue (9,88% vs 4,65%). Quando a cultura de sangue foi usada como controlo, a sensibilidade do PCR foi de 100% e a especificidade foi de 97,85% (Shang *et al.*, 2005). Estes dados provam que a técnica de PCR apresenta uma grande sensibilidade e especificidade fornecendo uma ferramenta importante no rápido diagnósticos de sepsis.

Outra forma de PCR que tem sido estudada para aplicação nestes casos que é o RT-PCR onde é usada uma transcriptase reversa para deteção de RNA ribossomal bacteriano. Um estudo de Fujimori *et al.*, 2010, debruçou-se sobre este assunto fazendo uma comparação entre esta técnica e a cultura de sangue normal mostrando que o RT-PCR acusou positivo todas as amostras positivas na cultura de sangue e mais algumas culturas que tinham acusado negativas nos testes sanguíneos (Fujimori *et al.*, 2010).

## Capítulo III- Conclusões

### Avaliação dos Biomarcadores

As duas grandes aplicações dos biomarcadores em sepsis são para diagnóstico, diferenciando SIRS de sepsis, e sepsis de sepsis severa e choque séptico e prognóstico fornecendo a capacidade de estratificar os pacientes de acordo com a previsão de resolução do seu caso. Estas aplicações são de enorme importância pois permitem uma avaliação mais rápida e posterior tratamento dependendo de cada caso.

Muitos pacientes com SIRS não necessitam de tomar antibióticos pois não apresentam infecção e ao administrar antibióticos em pacientes que não necessitam está-se a aumentar as resistências bacterianas aos mesmos. Da mesma maneira, um indivíduo com sepsis necessita de antibióticos o mais rápido possível de forma a evitar piorar o quadro. É por este motivo que os biomarcadores com boas propriedades diagnósticas são extremamente importantes pois são capazes de diferenciar sepsis de SIRS possibilitando, por sua vez, um modo de ação adequado. Já as propriedades prognósticas de um biomarcador são também bastante importantes pois ao avaliar os seus níveis é fornecida informações sobre como o paciente vai progredir e dessa forma são tomadas ações de acordo com essa progressão.

Todos estes fatores, se usados corretamente, são capazes de diminuir o tempo de internação e resolução de doença.

A partir dessa premissa, vários biomarcadores foram estudados de forma a concluir qual ou quais melhor se adequam tanto a diagnóstico como prognóstico. Para já os exames efetuados por rotina para o diagnóstico de sepsis são as medições de CRP, de PCT e as culturas celulares que indicam se existe ou não infecção. A nível prognóstico, vários marcadores oferecem boas ferramentas como por exemplo a PCT, sTREM, CD64, lactato, endocan, as IL-6 e 12, o MIF, a IL-10 e o HMGB-1 pois os seus níveis foram relacionados com severidade e mortalidade. A nível diagnóstico poucos marcadores oferecem boa sensibilidade e especificidade sendo que a grande maioria não consegue uma distinção entre sepsis e SIRS satisfatória. Os marcadores com melhores provas dadas nesse aspeto são a procalcitonina, o sTREM e o CD64 sendo que estes dois últimos apresentam resultados ainda mais promissores que a procalcitonina. Apesar do estudo dos

biomarcadores estar a ser intenso ainda são necessários muitos mais estudos de vários biomarcadores para se poder afirmar com certeza que existe um biomarcador ideal. Apesar de alguns oferecerem ferramentas importantes, de forma individual não são de grande significância sendo melhor usados em combinação com outros meios de diagnóstico como por exemplo, a cultura celular. As aplicações dos biomarcadores estão resumidas na tabela 8:

	Diagnóstico	Prognóstico
<b><i>CRP</i></b>	+/-	+/-
<b><i>PCT</i></b>	+	+
<b><i>LBP</i></b>	-	+/-
<b><i>PTX3</i></b>	+/-	+
<b><i>TNF-<math>\alpha</math></i></b>	-	-
<b><i>IL-6</i></b>	-	+
<b><i>IL-8</i></b>	-	+/-
<b><i>IL-12</i></b>	-	+
<b><i>MIF</i></b>	-	+
<b><i>IL-10</i></b>	-	+
<b><i>HMGB-1</i></b>	-	+
<b><i>sTREM</i></b>	++	+
<b><i>suPAR</i></b>	-	+
<b><i>CD64</i></b>	++	+
<b><i>Lactato</i></b>	-	+
<b><i>Endocan</i></b>	+/-	+
<b><i>Agentes Patogénicos</i></b>	+	-

**Tabela 8:** Resumos das aplicações dos biomarcadores estudados.

## Capítulo IV- Referências Bibliográficas

Andaluz-Ojeda, D. *et al.* (2012). A combined score of pro- and anti-inflammatory interleukins improves mortality prediction in severe sepsis. *Cytokine*, 57(3), pp. 332-336.

Backes, Y. *et al.* (2012). Usefulness of suPAR as a biological marker in patients with systemic inflammation or infection: a systematic review. *Intensive Care Med*, 38(9), pp. 1418-1428.

Balci, C. *et al.* (2002). Usefulness of procalcitonin for diagnosis of sepsis in the intensive care unit. *Crit Care*, 7, pp.85-90.

Bastrup-Birk, S. *et al.* (2013). Pentraxin-3 Serum Levels Are Associated with Disease Severity and Mortality in Patients with Systemic Inflammatory Response Syndrome. *PLoS ONE*, 8(9), e73119.

Behrendt, D. *et al.* (2004). Lipopolysaccharide binding protein in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*, 89, pp. 551-554.

Blairon, L., Wittebole, X., Laterre, P.F. (2003). Lipopolysaccharide-binding protein serum levels in patients with severe sepsis due to gram-positive and fungal infections. *J Infect Dis*, 187(2), pp.287-291.

Bloos, F., Reinhart, K. (2014). Rapid diagnosis of sepsis. *Virulence*, 5(1), pp. 154-160.

Boskabadi, H. *et al.* (2010). Serum Interleukin 8 Level as a Diagnostic Marker in Late Neonatal Sepsis. *Iran J Pediatr*, 20(1), pp. 41-47.

Bozza, F.A. *et al.* (2004). Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. *Shock*, 22(4), pp. 309-313.

Calandra, T. *et al.* (2000). Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med*, 6(2), pp. 164-170.

Cardelli, P. *et al.* (2008). Evaluation of neutrophil CD64 expression and procalcitonin as useful markers in early diagnosis of sepsis. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 21(1), pp. 43-49.

Cho, S.Y., Choi, J.H. (2014). Biomarkers o Sepsis. *Infect Chemother*, 46(1), pp. 1-12.

Chuang, T.Y. *et al.* (2014). High levels of serum macrophage migration inhibitory factor and interleukin 10 are associated with a rapidly fatal outcome in patients with severe sepsis. *Int J Infect Dis*, 20, pp. 13-17.

Cinel, I., Opal, S.M. (2009). Molecular biology of inflammation and sepsis: A primer. *Crit Care Med*, 37(1), pp. 291-304.

Cortegiani, A. *et al.* (2010). Use of CD64 for the diagnosis of sepsis: a case-control study. *Crit Care*, 14(1), P32.

Davies, M.G., Hagen, P.-O. (1997). Systemic Inflammatory response syndrome. *Brish Journ of Surgr*, 84(7), pp. 920-935.

Davis, B.H. *et al.* (2006). Neutrophil CD64 Is an Improved Indicator of Infection or Sepsis in Emergency Department Patients. *Arch Pathol Lab Med*, 130, pp. 654-661.

Donadello, K. *et al.* (2012). suPAR as a prognostic biomarker in sepsis. *BMC Med*, 10, 2.

Faix, J. D. (2013). Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 50(1), pp. 23-36.

Fujimori, M. *et al.* (2010). Efficacy of bacterial ribosomal RNA-targeted reverse transcription-quantitative PCR for detecting neonatal sepsis: a case control study. *BMC pediatr*, 10, 53.

Gañi, S. *et al.* (2007). High mobility group box-1 protein in patients with suspected community-acquired infections and sepsis: a prospective study. *Crit Care*, 11(2), R32.

Giamarellos-Bourboulis, E.J. *et al.* (2002). Procalcitonin: a marker to clearly differentiate systemic inflammatory response syndrome and sepsis in the critically ill patient?. *Intensive Care Med*, 28(9), 1351-6.

Goldstein, B. *et al.* (2005). International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*, 6(1), pp. 1-8.

Grieb, G. *et al.* (2010). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a promising biomarker. *Drug News Perspect*, 23(4), pp. 257-264.

Guven, H. *et al.* (2002). Diagnostic Value of Procalcitonin Levels as an Early Indicator of Sepsis. *Am J Emerg Med*, 20(3), pp. 202-206.

Hack, C.E. *et al.* (1992). Interleukin-8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators. *Infect Immun*, 60(7), pp. 2835-2842.

Harbarth, S. *et al.* (2001). Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 164(3), pp. 396-402.

Hattunen, R. *et al.* (2011). Plasma level of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor as a predictor of disease severity and case fatality in patients with bacteraemia: a prospective cohort study. *J Intern Med*, 270, pp. 32-40.

Hofer, N. *et al.* (2012). An update on the use of C-reactive protein in early-onset neonatal sepsis: Current insights and new tasks. *Neonatology*, 102, pp. 25-36.

Hou, L.C. *et al.* (2009). Severity of sepsis is correlated with the elevation of serum high-mobility group box 1 in rats. *Chin Med J (Engl)*, 122(4), pp. 449-454.

Hsu, K.H. *et al.* (2011). Comparison of Fcγ receptor expression on neutrophils with procalcitonin for the diagnosis of sepsis in critically ill patients. *Respirol*, 16, pp. 152-160.

Icardi, M. *et al.* (2009). CD64 Index Provides Simple and Predictive Testing for Detection and Monitoring of Sepsis and Bacterial Infection in Hospital Patients. *J Clin Microbiol*, 47(12), pp. 3914-3919.

Jat, K.R., Jhamb, U., Gupta, V.K. (2011). Serum lactate levels as the predictor of outcome in pediatric septic shock. *Indian J Crit Care Med*, 15(2), pp. 102-107.

Kibe, S., Adams, K., Barlow, G. (2011). Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. *J Antimicrob Chemother*, 66(2), pp. 33-40.

Koliski, A. *et al.* (2005). Blood lactate concentration as prognostic marker in critically ill children. *J Pediatr*, 81(4), pp. 287-292.

Krishna, U., Joshi, S.P., Modh, M. (2009). An evaluation of serial blood lactate measurement as an early predictor of shock and its outcome in patients of trauma or sepsis. *Indian J Crit Care Med*, 13(2), pp. 66-73.

Lassalle, P. *et al.* (2012). Endothelial cell specific molecule 1 is today a relevant marker of respiratory failure in sepsis and polytrauma patients. *Crit Care*, 16(3), P110.

Lehmann, L.E. *et al.* (2001). Plasma levels of macrophage migration inhibitory factor are elevated in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med*, 27(8), 1412-5.

Mancuso, G. *et al.* (1997). Role of interleukin 12 in experimental neonatal sepsis caused by group B streptococci. *Infect Immun*, 65(9), pp. 3731-3735.

Marie, C. *et al.* (1997). Presence of high levels of leukocyte-associated interleukin-8 upon cell activation and in patients with sepsis syndrome. *Infect Immun*, 65(3), pp. 865-871.

Marty, P. *et al.* (2013). Lactate clearance for death prediction in severe sepsis or septic shock patients during the first 24 hours in Intensive Care Unit: an observational study. *Ann Intensive Care*, 3(1), 3.

Maruna, P., Nedelníková, R., Gürlich, R. (2000). Physiology and Genetics of Procalcitonin. *Physiol Res*, 49(1), pp. 57-61.

Mikkelsen, M.E. *et al.* (2009). Serum lactate is associated with mortality in severe sepsis independent of organ failure and shock. *Crit Care Med*, 37(5), 1670-7.

Nylén, E.S. *et al.* (1998). Procalcitonin increases mortality and procalcitonin-recognizing antiserum improves mortality in an experimental model of sepsis. *Crit Care Med*, 26, pp. 1001-1006.

Orlikowsky, T.W. *et al.* (2006). Lipopolysaccharide-binding protein in noninfected neonates and those with suspected early-onset bacterial infection. *J Perinatology*, 26, pp. 115-119.

Palmiere, C., Augsburg, M. (2014). Markers for sepsis diagnosis in the forensic setting: State of the art. *Croat Med J*, 55, pp. 103-114.

Parmentier, E. *et al.* (2010). Endocan (endothelial cell-specific molecule-1) as a pertinent biomarker of endothelial dysfunction in sepsis. *Crit Care*, 14(2), P55.

Park, J.S. *et al.* (2005). High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol*, 290, pp. 917-924.

Pepys, M.B., Hirschfield, G.M. (2003). C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*, 111, pp. 1805-1812.

Perl, M. *et al.* (2006). Contribution of anti-inflammatory/immune suppressive processes to the pathology of sepsis. *Frontiers in Bioscience*, 11, pp. 272-299.

Pierrakos, C., Vincent, J.L. (2010). Sepsis Biomarkers: a review. *Crit Care*, 14(1), R15.

Póvoa, P. *et al.* (2005). C-reactive protein as a marker of infection in critically ill patients. *Clin Microbiol Infect*, 11(2), pp. 101-108.

Póvoa, P. *et al.* (2011). C-reactive protein, an early marker of community-acquired sepsis resolution: a multi-center prospective observational study. *Crit Care*, 15, R169.

Reinhart, K. *et al.* (2012). New Approaches to Sepsis: Molecular Diagnostics and Biomarkers. *Clin Microbiol Rev*, 25(4), pp. 609-634.

Rudiger, A., Stotz, M., Singer, M. (2008). Cellular processes in sepsis. *Swiss Med Wkly*, 138, pp. 629-634.

Scherpereel, A. *et al.* (2006). Endocan, a new endothelial marker in human sepsis. *Crit Care Med*, 34(2), pp. 532-537.

Schulte, W., Bernhagen, J., Bucala, R. (2013). Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets—an updated view. *Mediator Inflamm*, 2013: 165974. 10.1155/2013/165974.

Seeley, E.J., Matthay, M.A., Wolters, P.J. (2012). Infection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 303(5), pp. 355-363.

Shang, S. *et al.* (2005). Rapid Diagnosis of Bacterial Sepsis With PCR Amplification and Microarray Hybridization in 16S rRNA Gene. *Pediatr Res*, 58(1), pp. 143-148.

Sierra, R. *et al.* (2004). C-reactive protein used as an early indicator of infection in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Intens Care Med*, 30(11), pp. 2038-2045.

Silva, A.D. *et al.* (2006). *Terra, Universo de Vida. Biologia – 12º Ano*. Porto, Porto Editora.

Standage, S.W., Wong, H.R. (2011). Biomarkers for pediatric sepsis and septic shock. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 9(1), pp. 71-79.

Streimish, I. *et al.* (2012). Neutrophil Cd64 as a Diagnostic Marker in Neonatal Sepsis. *Pediatr Infect Dis*, 31(7), pp. 777-781.

Strimbu, K., Tavel, J.A. (2010). What are Biomarkers?. *Curr Opin HIV AIDS*, 5(6), pp. 463-466.

Su, L. *et al.* (2012). Value of soluble TREM-1, procalcitonin, and C-reactive protein serum levels as biomarkers for detecting bacteremia among sepsis patients with new fever in intensive care units: a prospective cohort study. *BMC Infect Dis*, 12, 157.

Uusitalo-Seppälä, R. *et al.* (2013). Pentraxin 3 (PTX3) Is Associated with Severe Sepsis and Fatal Disease in Emergency Room Patients with Suspected Infection: A Prospective Cohort Study. *PLoS ONE*, 8(1), e53661.

Villar, J. *et al.* (2009). Serum Lipopolysaccharide Binding Protein Levels Predict Severity of Lung Injury and Mortality in Patients with Severe Sepsis. *PLoS ONE*, 4(8), e6818.

Waage, A., Espevik, T. (1987). Association between tumor necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet*, 319, pp. 355-357.

Wagner, K.E. *et al.* (2002). Early immunoneutralization of calcitonin precursors attenuates the adverse physiologic response to sepsis in pigs. *Crit Care Med*, 30, pp. 2313-2321.

Ward, P.A. (2012). New approaches to the study of sepsis. *EMBO Mol Med*, 4, pp. 1234-1243.

Wu, Y. *et al.* (2012). Accuracy of plasma sTREM-1 for sepsis diagnosis in systemic inflammatory patients: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*, 16, R229.

Zhang, J. *et al.* (2011). Dynamic changes of serum soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) reflect sepsis severity and can predict prognosis: a prospective study. *BMC Infect Dis*, 11, 53.