

BRUNNA EULÁLIO ALVES

**AVALIAÇÃO DE MODULADORES DO AUMENTO DA
PERMEABILIDADE MICROVASCULAR E SUA
CORRELAÇÃO COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA NA SEPSE
EM PACIENTES ONCO-HEMATOLÓGICOS
NEUTROPÊNICOS FEBRIS**

CAMPINAS

2011



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO DE MODULADORES DO AUMENTO DA
PERMEABILIDADE MICROVASCULAR E SUA
CORRELAÇÃO COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA NA SEPSE
EM PACIENTES ONCO-HEMATOLÓGICOS
NEUTROPÊNICOS FEBRIS**

Brunna Eulálio Alves

Tese de Doutorado apresentada à Pós- graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas-UNICAMP para a obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração em Clínica Médica. Sob orientação do Prof. Dr. Erich Vinícius de Paula

CAMPINAS
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Al87a

Alves, Brunna Eulálio, 1979-

Avaliação de moduladores do aumento da permeabilidade microvascular e sua correlação com a evolução clínica na sepse em pacientes onco-hematológicos neutropênicos febris. / Brunna Eulálio Alves. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Erich Vinicius de Paula
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sepse. 2. Neutropenia. 3. Fator A de crescimento do endotélio. 4. Angiopoietina-1. 5. Angiopoietina-2. I. Paula, Erich Vinicius de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of modulators of increased microvascular permeability and its correlation with clinical outcome in sepsis in patients with hematologic malignancies and febrile neutropenia

Palavras-chave em inglês:

Sepsis

Neutropenia

Vascular Endothelial Growth Factor A

Angiopoietin-1

Angiopoietin-2

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Banca examinadora:

Erich Vinicius de Paula [Orientador]

Abrahão Elias Hallack Neto

Vânia Maris Morelli

Afonso Celso Vigorito

Simone Cristina Olenscki Gilli

Data da defesa: 10-06-2011

Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

Banca examinadora da tese de Doutorado

Brunna Eulálio Alves

Orientador: Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula

Membros:

1. Prof. Dr. Abrahão Elias Hallack Neto

2. Prof^a. Dr^a. Vânia Maris Morelli

3. Prof. Dr. Afonso Celso Vigorito

4. Prof^a. Dr^a. Simone Cristina Olenscki Gilli

5. Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 10/06/2011

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, a quem devo tudo e sem os quais certamente não chegaria tão longe.

Ao meu marido, Alan, pelo apoio, carinho e compreensão.

Às minhas queridas irmãs, Renata e Vanessa e ao meu cunhado Marcel.

AGRADECIMENTOS

Ao Erich, meu orientador e amigo, pela confiança, pelo apoio irrestrito em todas as etapas deste trabalho e pela orientação que ultrapassa a tese.

Ao Aranha, mais que um amigo, pelas valiosas discussões ao longo da realização deste trabalho, sempre dosando as críticas com comentários de incentivo.

Aos professores Dra. Irene, Dra. Joyce e Dr. Cármino pela colaboração.

Aos amigos do laboratório de Hemostasia do Hemocentro da Unicamp, em especial, Silmara, Bruna e Tânia, da enfermagem de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Unicamp, aos residentes da hematologia e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Este estudo foi financiado com recursos fornecidos pela FAPESP, projeto temático número 2007/55904-0 e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue/CNPq.

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO	xxiii
ABSTRACT	xxvii
1- INTRODUÇÃO	31
1.1- Sepses	33
1.1.1- Definição e epidemiologia.....	33
1.1.2- Fisiopatologia	35
1.1.2.1- O papel do endotélio na manutenção da barreira endotelial	37
1.1.2.2- VEGF-A	38
1.1.2.3- Angiopietinas	42
1.2- Neutropenia e sepses	45
2- OBJETIVOS	47
3- MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1- Pacientes	53
3.2- Definição de sepses e estratificação do risco	54
3.3- Coleta de dados clínicos e laboratoriais	56
3.4- Coleta e preparação das amostras de sangue	59
3.5- Análise dos níveis séricos de VEGF-A e sFlt-1	59
3.6- Análise dos níveis séricos de Ang-1 e Ang-2	60
3.7- Determinação dos níveis de Fator de von Willebrand	60
3.8- Determinação dos valores da faixa normal	60
3.9- Análise estatística	61

4- RESULTADOS.....	63
4.1- Características dos pacientes.....	65
4.2- Avaliação dos níveis séricos de VEGF-A, sFlt-1, Ang-1 e Ang-2 em indivíduos saudáveis e em pacientes portadores de neoplasia hematológica à admissão	69
4.2.1- VEGF-A e sFlt-1	69
4.2.2- Ang-1 e Ang-2.....	71
4.3- Avaliação dos níveis séricos de VEGF-A, sFlt-1, Ang-1 e Ang-2 em pacientes com neutropenia febril	72
4.3.1- VEGF-A e sFlt-1	72
4.3.2- Ang-1 e Ang-2.....	75
4.4- Correlação entre os níveis séricos de VEGF-A, sFlt-1, Ang-1 e Ang-2 e a gravidade da sepse	79
4.4.1- VEGF-A e sFlt-1	79
4.4.2- Ang-1 e Ang-2.....	80
4.5- Estimativa da acurácia diagnóstica dos níveis séricos de VEGF-A, sFlt-1, Ang-1 e Ang-2	81
4.6- Análise combinada dos níveis séricos de VEGF-A e sFlt-1	83
4.7- Relação Ang-2/ Ang-1 e a mortalidade dos pacientes com Neutropenia Febril no dia 30	85
4.8- Avaliação dos níveis plasmáticos do Fator de von Willebrand (FvW) em pacientes com neutropenia febril	86
5- DISCUSSÃO.....	87
6- CONCLUSÕES	99
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
8- APÊNDICES.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS

SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
IL	Interleucina
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alpha
VE	“Vascular Endothelial”
VEGF-A	“Vascular endothelial growth factor”; fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR	Receptor do VEGF-A
Flt-1	“Fms- like tyrosine kinase”; VEGFR-1
Flk-1	“Fetal liver kinase 1”; VEGFR-2
sFlt-1	“ Soluble Flt-1”, receptor solúvel do VEGF-A
Ang	Angiopietina
Tie2	“Tirosyne kinase receptor 2”; receptor das Angiopietinas
TCPH	Transplante de Células Progenitoras Hematopoiéticas
MASCC	“Mutinational Association for Supportive Care in Cancer”; Índice da Associação Multinacional de Cuidados e Assistência ao Câncer
SOFA	“Sequential Organ Failure Assessment”
FvW	Fator de Von Willebrand
NF	Neutropenia febril

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1- MASCC.....	55
Tabela 2- SOFA	56
Tabela 3- Características dos pacientes	68
Tabela 4- Níveis de sFlt-1 em indivíduos saudáveis e pacientes portadores de neoplasia hematológica à admissão.....	70
Tabela 5- Níveis de Ang-1 e Ang-2 em indivíduos saudáveis e pacientes portadores de neoplasia hematológica à admissão	72
Tabela 6- Correlação dos níveis séricos de VEGF-A e sFlt-1 com a gravidade da sepse.....	80
Tabela 7- Correlação dos níveis séricos de Ang-1, Ang-2 e da relação Ang-2/Ang-1 com a gravidade da sepse	81
Tabela 8- Estimativa da acurácia diagnóstica dos níveis séricos de VEGF-A, sFlt-1, Ang-2 e da relação Ang-2/Ang-1	82
Tabela 9- Níveis plasmáticos do Fator de von Willebrand em pacientes portadores de neoplasia hematológica com neutropenia febril	86

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1- Fisiopatologia da sepse	37
Figura 2- Mecanismo de ação através do qual o VEGF-A controla a permeabilidade vascular.....	41
Figura 3- Sinalização Angiopoitinas-Tie2 na regulação da integridade da barreira endotelial	44
Figura 4- Ficha de coleta de dados	58
Figura 5- Fluxograma do estudo.....	67
Figura 6- Níveis séricos de VEGF-A e sFlt-1 em pacientes neutropênicos febris no início da neutropenia febril	74
Figura 7- Níveis séricos de VEGF-A e sFlt-1 em pacientes neutropênicos febris horas após o primeiro pico febril	75
Figura 8- Níveis séricos de Ang-1, Ang-2 e relação Ang-2/Ang-1 em pacientes neutropênicos febris no início da neutropenia febril.....	77
Figura 9- Níveis séricos de Ang-1, Ang-2 e relação Ang-2/Ang-1 em pacientes neutropênicos febris 48 horas após o início da neutropenia febril.....	78
Figura 10- Análise combinada dos níveis de VEGF-A e sFlt-1 em pacientes neutropênicos febris	84
Figura 11- Sobrevida de pacientes com neutropenia febril de acordo coma relação Ang-2/Ang-1 no início da neutropenia febril	85

Pacientes portadores de neoplasia hematológica e neutropenia febril representam um grupo de risco elevado de sepse e choque séptico. Nas últimas décadas, estratégias terapêuticas alvo-específicas para a sepse não modificaram de forma significativa a sobrevida dos pacientes e o tratamento permanece baseado em antibioticoterapia e cuidados de suporte, com altas taxas de mortalidade. A quebra da barreira endotelial é um evento fundamental na fisiopatologia do choque séptico e a compreensão dos mecanismos envolvidos neste evento tem o potencial de auxiliar na identificação de novos biomarcadores de gravidade e de novos alvos terapêuticos para estes pacientes. Estudos recentes demonstraram a participação do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF-A), do seu receptor solúvel (sFlt-1) e das angiopoietinas 1 e 2, proteínas envolvidas na angiogênese e na regulação da integridade da barreira endotelial na fisiopatogenia do choque séptico em pacientes não oncológicos internados em unidade de terapia intensiva.

Neste trabalho, avaliamos prospectivamente a cinética do VEGF-A, do sFlt-1 e das angiopoietinas 1 e 2 durante as 48 horas iniciais da neutropenia febril em 41 pacientes portadores de neoplasia hematológica submetidos a quimioterapia intensiva ou a regime de condicionamento para transplante de células progenitoras hematopoiéticas, através da dosagem dos mesmos por ensaio imuno-enzimático. Exploramos também a associação dos níveis séricos destes biomarcadores com a gravidade da sepse através da correlação com o MASCC, um índice desenvolvido para identificar pacientes com neutropenia febril de baixo risco, e com o SOFA, um escore de avaliação de disfunção orgânica em pacientes com sepse, ambos amplamente aceitos.

A evolução para choque séptico foi associada a níveis significativamente maiores de VEGF-A, sFlt-1 e angiopoietina-2 48 horas após o início da neutropenia febril quando

comparado aos valores em pacientes com sepse não complicada e a estimativa da acurácia diagnóstica sugere a capacidade de discriminar os pacientes que evoluíram com choque séptico. Estes biomarcadores também apresentaram correlação com os escores gravidade, sugerindo a relevância biológica da associação.

Em conclusão, nossos achados sugerem que a avaliação destes biomarcadores em pacientes com neutropenia febril deve ser avaliada em estudos com maior número de pacientes, quanto ao seu potencial de incorporação na prática clínica. Além disso, os resultados reforçam o potencial terapêutico da intervenção nestas vias para o tratamento da sepse.

ABSTRACT

Patients with hematologic malignancy and neutropenia represent a group at high risk of sepsis and septic shock. In recent decades, target-specific therapeutic strategies for sepsis did not change significantly the survival of patients and treatment is still based on antibiotic therapy and supportive care, with high mortality rates. The breakdown of the endothelial barrier is a key event in the pathophysiology of septic shock and understanding of the mechanisms involved in this event has the potential to assist in the identification of new biomarkers and severity of new therapeutic targets for these patients. Recent studies have demonstrated the involvement of endothelial growth factor (VEGF-A), its soluble receptor (sFlt-1) and angiopoietins 1 and 2, proteins involved in angiogenesis and in regulation of endothelial barrier integrity in the pathogenesis of shock septic patients without cancer admitted to the intensive care unit.

In this study, we prospectively evaluated the kinetics of VEGF-A, sFlt-1 and angiopoietins 1 and 2 during the initial 48 hours of febrile neutropenia in 41 patients with hematological malignancy undergoing intensive chemotherapy or conditioning regimen for stem cell transplantation hematopoietic cells by the same dosage by enzyme immunoassay. We also explored the association of serum levels of these biomarkers with the severity of sepsis through correlation with the MASCC, an index developed to identify patients with febrile neutropenia at low risk, and the SOFA score for assessment of organ dysfunction in patients with sepsis, both widely accepted.

Progression to septic shock was associated with significantly higher levels of VEGF-A, sFlt-1 and angiopoietin-2 48 hours after the onset of febrile neutropenia when compared to values in patients with uncomplicated sepsis and the estimation of diagnostic accuracy

suggests the ability to discriminate among patients who developed septic shock. These biomarkers also correlated with the severity scores, suggesting the biological relevance of the association.

1.1 – Seps

1.1.1 - Definição e epidemiologia

O termo seps foi originalmente utilizado na prática clínica para indicar a presença de bactérias na corrente sanguínea (bacteremia). Em 1989, Bone et al. estabeleceram uma nova definição para seps baseada em critérios clínicos específicos e em uma fonte conhecida de infecção. Mas, já em 1991, foi observado que estes mesmos sinais clínicos também estavam presentes com frequência em pacientes sem evidência de bacteremia, como vítimas de trauma grave e queimaduras e, simultaneamente, que a seps estava associada a uma reação inflamatória generalizada do organismo, distante do órgão original da injúria, o que levou a introdução, pela Society of Critical Care Medicine e pelo American College of Chest Physicians, do termo Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) e da definição dos termos Seps, Seps Grave e Choque Séptico (Bone et al., 1992).

A resposta inflamatória sistêmica é caracterizada pela presença de pelo menos dois dos seguintes critérios clínicos: (a) hipotermia (temperatura $< 36^{\circ}\text{C}$) ou febre (temperatura $\geq 38^{\circ}\text{C}$), (b) taquicardia (frequência cardíaca > 90 batimentos/ minuto), (c) taquipnéia (frequência respiratória > 20 incursões respiratórias/ minuto) ou $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg, e (d) leucocitose (> 12 mil leucócitos/ mm^3) ou leucopenia (< 4 mil leucócitos/ mm^3) ou $> 10\%$ de leucócitos imaturos no sangue periférico. A seps é definida como uma resposta inflamatória sistêmica secundária a uma infecção (Bone et al., 1992). Apesar desta definição, o diagnóstico microbiológico definitivo não pode ser estabelecido em cerca de

um terço ou mais dos pacientes com manifestações clínicas de sepse (Marshall e Reinhart, 2009). Quando associada à disfunção orgânica ou hipotensão arterial (pressão arterial sistólica menor que 90 mmHg ou pressão arterial média menor que 70 mmHg), a sepse é denominada sepse grave e, quando a hipotensão é refratária à reposição volêmica adequada, o quadro é denominado de choque séptico (Bone et al., 1992). A evolução para sepse grave ocorre em aproximadamente metade dos pacientes sépticos e para choque séptico em 25% (Brun-Buisson, 2000).

Sepse grave e choque séptico representam importantes problemas de saúde, afetando milhares de pessoas em todo mundo e, são a principal causa de morte entre pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva não coronariana. A incidência da sepse vem aumentando, de 1,5% a 8% ao ano, e a taxa de mortalidade permanece alta, variando de 50% a mais de 75%, a despeito do conhecimento crescente sobre sua fisiopatologia e dos avanços tecnológicos e em cuidados de suporte destinados a estes pacientes. Nos Estados Unidos, por exemplo, ocorrem mais de 750 mil casos de sepse por ano, com cerca de 220 mil mortes (Angus et al., 2001). Dados sobre a prevalência e o prognóstico da sepse no Brasil são escassos. Em um estudo multicêntrico, casos de sepse foram responsáveis por 27,3 % das internações em Unidades de Terapia Intensiva, com aproximadamente 57 casos por 1000 pacientes –dia e mortalidade de até 52,2 % (Silva et al., 2004).

Vários fatores podem contribuir para um aumento da predisposição à sepse, bem como para sua gravidade. Polimorfismos nos genes das citocinas, idade avançada, presença de comorbidades (câncer, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, hepatopatia crônica), ingestão abusiva de álcool e presença de dispositivos de acesso venoso são alguns

exemplos (Williams et al., 2004; O'Brien et al., 2007). A importância do câncer como fator de risco é confirmada pelo fato que de cada seis pacientes com sepse grave um é portador de doença neoplásica e ainda que estes pacientes apresentam mortalidade 30% maior do que a de pacientes sem câncer (Angus et al., 2001). Estes dados foram confirmados por Williams MD et al que observaram uma taxa de sepse grave três a cinco vezes maior em pacientes com câncer, com incidência e mortalidade variáveis entre os diversos tipos de neoplasia, mas significativamente maior entre os portadores de neoplasia hematológica (incidência de 66.4 por 1000 e risco de sepse grave 15 vezes maior que na população sem câncer) do que entre os portadores de tumores sólidos (incidência de 7.6 por 1000, risco de sepse grave 1,8 vezes maior que na população sem câncer). Outro aspecto relevante é o pouco impacto da idade na incidência e gravidade da sepse nos pacientes com câncer, o que pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo papel da administração de quimioterapia intensa em pacientes mais jovens (Williams et al., 2004).

1.1.2 - Fisiopatologia

Embora o mecanismo desencadeante da sepse esteja relacionado à liberação de endotoxinas por microorganismos infectantes, as manifestações clínicas não são causadas diretamente pelo agente infeccioso, mas sim pela resposta desregulada dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Esta resposta inclui a liberação de citocinas, ativação de neutrófilos, monócitos, células endoteliais, do sistema complemento, da cascata da coagulação e do sistema fibrinolítico (Cohen, 2002; Aird, 2003; Lolis e Bucala, 2003) (Figura 1). A importância desta resposta inflamatória é confirmada por dados da literatura que

demonstram que as taxas de mortalidade são crescentes entre os pacientes com SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico e permanecem altas a despeito da terapia antibiótica adequada (Rangel-Frausto et al., 1995). Além disso, a administração de anticorpos contra componentes da parede bacteriana não melhora a sobrevida dos pacientes (Angus et al., 2000).

As citocinas, proteínas secretadas pelos componentes do sistema imune e que agem como efetores ou moduladores da resposta inflamatória desempenham papel fundamental no desenvolvimento da sepse. Pacientes com sepse apresentam níveis significativamente aumentados de Interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-10 e Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α e estes apresentam correlação com a gravidade do quadro (Webster e Galley, 2009; van der Poll e van Deventer, 1999). As citocinas funcionam como importantes elementos no “cross-talk”, ou interações, entre os estímulos iniciais que desencadeiam a sepse, e os mecanismos efetores finais envolvidos em sua patogenia, entre os quais destaca-se a quebra da barreira endotelial.

Figura 1 - Fisiopatologia da sepse

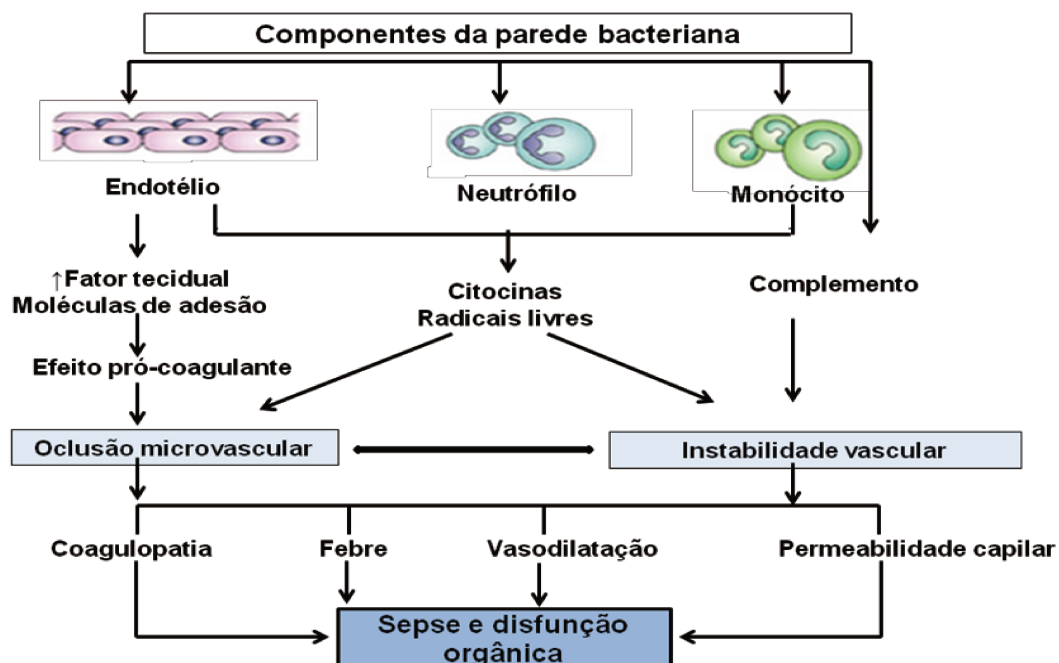


Figura 1 - Esquema ilustrando a fisiopatologia da sepse. A exposição a componentes da parede bacteriana é o mecanismo desencadeante da sepse, determinando a ativação de células endoteliais, de neutrófilos e monócitos, a liberação de citocinas e a ativação do sistema do complemento e da cascata da coagulação, com instabilidade vascular e oclusão microvascular. A resposta do hospedeiro é determinante para as manifestações clínicas da sepse: febre, coagulopatia, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (Figura adaptada de Lolis e Bucala, 2003).

1.1.2.1 - O papel do endotélio na manutenção da barreira endotelial

O endotélio é o responsável pela interface entre tecidos e sangue e, sob condições fisiológicas, as células endoteliais exercem diversas funções responsáveis pela manutenção

da hemostasia. Estudos pré-clínicos e clínicos de sepse têm mostrado que a resposta inflamatória sistêmica aguda resulta em ativação endotelial excessiva, sustentada e generalizada, com importantes alterações estruturais e funcionais no endotélio. Este estado de ativação endotelial implica em expressão de moléculas de adesão, produção de substâncias vasoativas e de mediadores inflamatórios, modificação de um estado anti-inflamatório e anti-trombótico para pró-inflamatório e pró-trombótico e alteração da permeabilidade vascular. Neste cenário, uma característica marcante é a perda da função de barreira, decorrente do aumento da permeabilidade endotelial, que ocorre em vários órgãos na sepse e é o responsável pela progressão para o choque séptico (Aird, 2003; Hack e Zeerleder, 2001; Spronk et al., 2004).

A permeabilidade vascular é regulada primariamente pelas junções intercelulares do tipo “adherens”, cuja estrutura molecular é constituída por proteínas transmembrana denominadas “VE-cadherin” (vascular endothelial cadherin). A estabilidade da VE-cadherin, crítica para manutenção da integridade e da permeabilidade endotelial, é regulada através da ação de vários agentes vasoativos, como histamina, trombina, Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α , Interleucina (IL)-1, Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF-A) e angiopoietinas (Murakami e Simons, 2009). O controle da permeabilidade endotelial é, pois, um potencial alvo terapêutico na sepse.

1.1.2.2 - VEGF –A

O VEGF-A, um fator de crescimento endotelial conhecido pelo seu papel crítico na vasculogênese e na angiogênese, é uma molécula chave no controle da permeabilidade

vascular, e um potente agente promotor de permeabilidade endotelial, com potência até 20 mil vezes superior à da histamina. Ele foi inicialmente descrito como um fator secretado por linhagens celulares de carcinoma que aumentava a permeabilidade dos vasos da pele e induzia a formação de ascite (Senger et al., 1983). Sua ação no endotélio é mediada por dois receptores transmembrana, o Flt-1 (VEGFR-1) e o Flk-1 (VEGFR-2). A afinidade do Flt-1 pelo VEGF-A é dez vezes maior do que a do Flk-1, porém sua atividade, dez vezes mais fraca, o que faz do Flk-1 o mediador primário das ações do VEGF-A, restando ao Flt-1 um papel negativo na sinalização, seja por suprimir a sinalização através do Flk-1, seja por agir como um receptor “armadilha”. O Flt-1 também é naturalmente produzido como um receptor solúvel, através de uma variante de “splicing”. Este se liga ao VEGF-A, bloqueando a sua interação com seus receptores nas superfícies celulares, agindo, portanto, como um antagonista natural. Estímulos para liberação de VEGF-A incluem hipóxia, citocinas, e lipopolissacarídeos da parede bacteriana e possivelmente também leucócitos e plaquetas (Ferrara et al., 2003; Byrne et al., 2005).

O mecanismo pelo qual o VEGF-A regula a função de barreira parece ser mediado pela endocitose da VE-cadherin, logo após a ligação do VEGF-A ao receptor Flk-1, modificando rapidamente a arquitetura das junções intercelulares e permitindo o extravasamento de fluídos e macromoléculas (Gavard e Gutkind, 2006)(Figura 2).

O VEGF-A também promove a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL)-6 e IL-8, de moléculas inflamatórias de adesão celular e de moléculas pró-coagulantes e tem sido implicado em várias patologias que cursam com inflamação e edema, incluindo a sepse. Vários autores têm demonstrado níveis aumentados de VEGF-A

em pacientes com sepse, bem como sua correlação com a gravidade dos casos (Pickkers et al., 2005; van der Flier et al., 2005; Shapiro et al., 2008).

Consistente com o efeito de antagonista natural do sFlt-1 sobre a sinalização do VEGF-A, foi observado que em modelos animais de sepse, o efeito hiperpermeabilizante do VEGF-A também pode ser antagonizado pela administração do sFlt-1, resultando em redução da severidade da resposta inflamatória, da morbidade e da mortalidade dos casos de sepse (Yano et al., 2006). Estes achados sugerem um papel terapêutico de estratégias que modulam o eixo VEGF-A/sFlt-1 .

Figura 2 - Mecanismo de ação através do qual o VEGF-A controla a permeabilidade vascular.

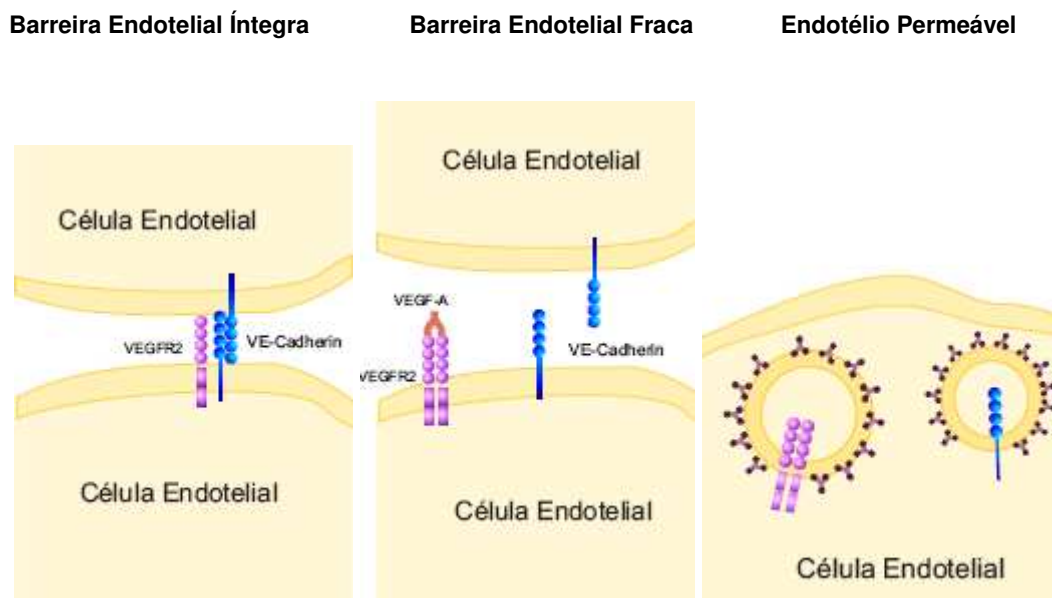


Figura 2 - Esquema ilustrando o mecanismo molecular através do qual o VEGF-A promove a internalização da “VE-cadherin” e a permeabilidade vascular. A barreira endotelial é mantida pela integridade das junções intercelulares do tipo “adherens”, constituídas pela interação entre as “VE-cadherin” de duas células vizinhas. O VEGFR-2 está associado à molécula de “VE-cadherin” e quando ativado pela ligação com o VEGF-A promove ativação de uma série de reações que culminam com a internalização da “VE-cadherin” e conseqüente perda da barreira endotelial. A “VE-cadherin” pode ser reciclada para a superfície celular, participando da reorganização das junções do tipo “adherens” (Figura adaptada de Gavard e Gutkind, 2006).

1.1.2.3 - Angiopoietinas

As angiopoietinas (Ang) constituem uma família de fatores de crescimento essenciais para a formação e estabilidade dos vasos sanguíneos, dos quais os principais representantes são as Ang-1 e Ang-2. Elas se ligam com igual afinidade ao mesmo domínio do receptor tirosino-quinase Tie-2 presente em células endoteliais, através do qual exercem suas funções. A Ang-1 é expressa em condições fisiológicas por células musculares lisas e outras células perivasculares e promove a interação entre estas células, as células endoteliais e a matriz extra-celular, promovendo um estado de quiescência vascular, caracterizado por integridade da barreira endotelial e por propriedades anti-inflamatórias e anti-trombóticas. Em contraste, a Ang-2 é primariamente produzida pelas células endoteliais e fica armazenada nos corpos de Weibel-Palade. Quando liberada, como em casos de lesão vascular ou em outras condições fisiológicas em que a perda da integridade endotelial é necessária, liga-se ao receptor Tie-2 e exerce funções antagônicas às da Ang-1, promovendo desestabilização endotelial, com conseqüente transição de um fenótipo quiescente para um fenótipo ativado (Augustin et al., 2009; Thomas e Augustin, 2009) (Figura 3). Este estado dinâmico entre endotélio quiescente e endotélio ativado é fundamental durante o processo de angiogênese embrionária, quando novas células endoteliais são incorporadas aos tubos endoteliais primitivos, o que exige a quebra temporária da função de barreira. Além disso, durante o processo de angiogênese no embrião, a Ang-1 é fundamental para o recrutamento das células musculares lisas e outras células perivasculares, que também contribuem para a estabilização e maturação dos vasos primitivos (Conway et al., 2001).

Em estudos com camundongos transgênicos, a Ang-1 mostrou proteger a vasculatura de camundongos adultos dos efeitos permeabilizantes do VEGF-A e de outros estímulos inflamatórios, como o TNF – α (Thurston et al., 1999; Thurston et al., 2000). O mecanismo de ação da Ang-1 envolve a inibição da internalização da VE-cadherin induzida pelo VEGF-A (Murakami e Simons, 2009). Quanto às propriedades anti-inflamatórias e anti-trombóticas da Ang-1, elas são mediadas, respectivamente, pela inibição da expressão de moléculas inflamatórias de adesão e do fator tissular, induzidas pelo VEGF-A e por outras citocinas inflamatórias (Augustin et al., 2009). Por sua vez, a produção de Ang-2 é induzida pela hipóxia e pelo VEGF-A, entre outros fatores, e inibida pela sinalização Ang-1-Tie2 (Augustin et al., 2009; Maisonpierre et al., 1997; Fiedler et al., 2006). Por seus efeitos críticos e aparentemente antagônicos nos processos de controle da integridade da barreira endotelial, os níveis circulantes de Ang-1 e Ang-2 foram avaliados em estudos pré-clínicos e clínicos relacionados à sepse. Em modelos de endotoxemia em camundongos, a administração de Ang-1 foi capaz de reduzir a permeabilidade vascular e a mortalidade dos camundongos, sugerindo que o efeito estabilizador desta citocina pode ter relevância na fisiopatogenia da sepse (Witzenbichler et al., 2005). Em pacientes, os níveis de Ang-2 se mostraram excessivamente elevados e apresentaram correlação com a gravidade do quadro, corroborando a relevância clínica das alterações do eixo Ang-1/Ang-2/Tie2 na sepse (Giuliano et al., 2007; Kumpers et al., 2008; Kumpers et al., 2009; Parikh et al., 2006; Siner et al., 2009).

Figura 3 - Sinalização Angiopietinas- Tie2 na regulação da integridade da barreira endotelial

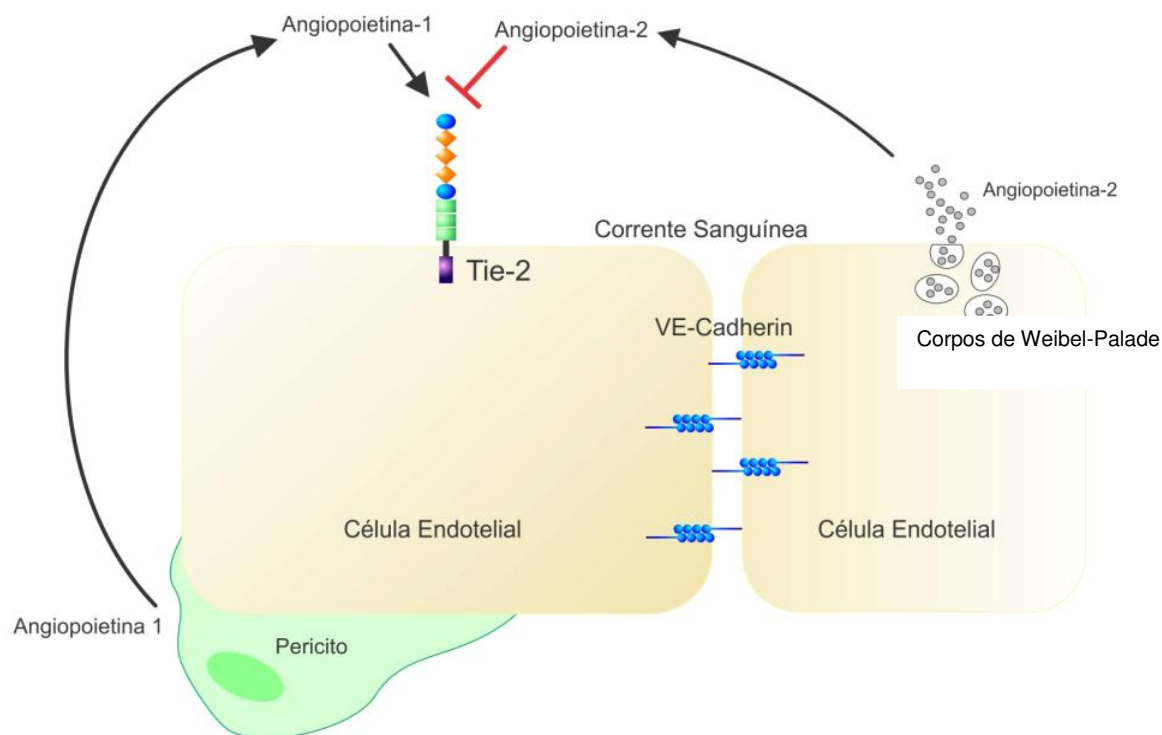


Figura 3 - Esquema ilustrando a sinalização Ang-Tie2. A Ang-1, produzida por células perivasculares, se liga ao receptor Tie2 induzindo sua fosforilação e promovendo entre outras ações, a inibição da sinalização mediada pelo VEGFR-2 e, com isso, a internalização da “VE-cadherin”, reduzindo a permeabilidade endotelial. Esta sinalização é antagonizada pela Ang-2, liberada dos corpos de Weibel-Palade após estímulos inflamatórios, entre outros (Figura adaptada de Augustin HG et al., 2009)

1.2 - Neutropenia e sepse

As infecções representam uma importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes portadores de neoplasia hematológica. A doença hematológica por si pode predispor o paciente a infecções graves e recorrentes como consequência de anormalidades quantitativas e /ou qualitativas em um ou mais componentes do sistema de defesa. Somam-se a estas, complicações relacionadas ao tratamento quimioterápico, como a utilização de dispositivos de acesso venoso de longa duração, a mucosite, com ruptura da integridade da mucosa da cavidade oral, do esôfago e do intestino, favorecendo a translocação bacteriana, e a neutropenia (Morrison, 2005).

A neutropenia resultante de toxicidade hematológica dos quimioterápicos e/ou da substituição da medula óssea por células neoplásicas representa o mais importante fator de risco de infecção nestes pacientes. Este risco é determinado pela intensidade da neutropenia (mais pronunciado na neutropenia grave, ou seja, com contagens inferiores a 500/ μ l) e pela sua duração e ambos também influenciam diretamente a gravidade do quadro clínico (Bodey et al., 1966).

Embora a maioria dos sinais e sintomas de infecção sejam sutis ou mesmo ausentes em pacientes neutropênicos, a febre permanece uma manifestação precoce (Pizzo, 1993). Mais de 60% dos pacientes neutropênicos febris apresentam infecção, que se não tratada rapidamente pode evoluir para choque séptico com taxas de mortalidade de até 50% nas primeiras 48 horas, principalmente naqueles pacientes com evidência microbiológica de infecção (aproximadamente 12-30% dos pacientes neutropênicos febris) (Klastersky et al., 2007).

Concentrações séricas de várias citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-8, proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa, moléculas de adesão e, mais recentemente, da procalcitonina vêm sendo avaliadas com a finalidade de estratificar os pacientes neutropênicos febris quanto ao risco de evolução com sepse grave. No entanto, dados da literatura mostram que os valores preditivos de todos estes parâmetros são muito baixos para que eles possam determinar a decisão terapêutica (Sudhoff et al., 2000).

Frente à gravidade do quadro e à indisponibilidade de testes diagnósticos rápidos e precisos (sensíveis e específicos) que permitam a distinção entre febre de origem infecciosa e não-infecciosa, o princípio fundamental do manejo de pacientes neutropênicos febris após quimioterapia consiste na avaliação de possíveis focos e microorganismos envolvidos e na administração precoce de antibióticos de amplo espectro (Cohen e Drage, 2011; Hughes et al., 2002).

A descoberta de testes ou marcadores que permitam prever a evolução para sepse grave e choque séptico neste grupo de pacientes pode ajudar a reduzir a mortalidade relacionada ao tratamento, bem como, representar alvos terapêuticos potenciais.

2 - OBJETIVOS

Este trabalho teve como **objetivo geral** caracterizar variações nos níveis de mediadores potencialmente envolvidos no aumento da permeabilidade microvascular na sepse, e correlacionar estes achados com a gravidade da sepse em pacientes neutropênicos febris, buscando aprimorar a compreensão da fisiopatologia do aumento da permeabilidade microvascular, e a identificação de alvos terapêuticos relevantes e pouco explorados. Para este fim os **objetivos específicos** foram:

- 1 - Avaliar os níveis séricos de VEGF-A, sFlt-1 Ang-1 e Ang-2 em pacientes neutropênicos febris durante a evolução inicial da sepse;
- 2 - Verificar a correlação entre os níveis séricos de VEGF-A, sFlt-1, Ang-1 e Ang-2 e a gravidade da sepse.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Pacientes

Foram incluídos neste estudo pacientes com neoplasia hematológica admitidos para tratamento quimioterápico ou Transplante de Células Progenitoras Hematopoiéticas (TCPH) alogênico ou autólogo nas enfermarias de Hematologia e de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da UNICAMP no período de março de 2008 a março de 2009.

Com o objetivo de selecionar os pacientes com alto risco de infecção, ou seja, com neutropenia grave e de duração superior a 7 dias, entre os pacientes admitidos para quimioterapia apenas aqueles submetidos à terapia de indução ou reindução para leucemias agudas e terapia de resgate para linfomas foram incluídos. Estes pacientes, à semelhança daqueles submetidos a Transplante de Células Progenitoras Hematopoiéticas, deveriam permanecer internados durante todo o período da aplasia, para garantir controle rigoroso do momento da coleta de amostras de sangue após o desenvolvimento da neutropenia febril.

Foram excluídos os pacientes que já se apresentavam febris à admissão. Não existiram outros critérios de exclusão, incluindo idade ou presença de comorbidades.

No momento da internação, os pacientes e/ou seus responsáveis legais foram informados dos objetivos da pesquisa e dos procedimentos necessários (coleta de amostras de sangue e acesso às informações contidas no prontuário médico) para a participação e aqueles que concordaram assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Apenas os pacientes que evoluíram com neutropenia grave (< 500 neutrófilos / μ l) e febre (temperatura $\geq 38^{\circ}$ C) completaram o estudo.

3.2 - Definição de sepse e estratificação de risco

Como de acordo com protocolos de manejo atuais, em pacientes neutropênicos febris a febre deve sempre ser considerada como de origem infecciosa (Hughes et al., 2002), nesta população a sepse foi definida pela presença de dois ou mais dos seguintes achados: (1) temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$, (2) frequência cardíaca > 90 batimentos por minutos, (3) frequência respiratória > 20 incursões por minuto ou $\text{PaCO}_2 < 32\text{ mmHg}$. O diagnóstico de choque séptico foi estabelecido nos pacientes com sepse que apresentaram hipoperfusão tecidual ou hipotensão arterial (pressão sistólica $< 90\text{ mmHg}$ ou redução na pressão sistólica basal $> 40\text{ mmHg}$), a despeito de reposição volêmica adequada.

Os pacientes com sepse foram ainda estratificados quanto ao risco da neutropenia febril e a gravidade do quadro através da utilização do índice MASCC (Multinational Association for Supportive Care in Câncer) e do escore SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*). O índice MASCC (Tabela 1) foi desenvolvido pela Associação Multinacional de Cuidados e Assistência ao Câncer com a finalidade de identificar pacientes neutropênicos febris de baixo risco, isto é, com alta probabilidade de resolução do quadro febril sem complicações potencialmente fatais. Para o seu cálculo são considerados o tipo e o status da doença oncológica, a idade do paciente, a presença de comorbidades (doença pulmonar obstrutiva crônica e de infecção fúngica prévia), o regime de tratamento (ambulatorial ou internado) e o quadro clínico do paciente no momento da avaliação (presença de desidratação e hipotensão arterial). Pacientes com neutropenia febril de baixo risco apresentam índice MASCC ≥ 21 e pacientes com neutropenia febril de alto risco, índice MASCC < 21 (Klastersky et al., 2000). O SOFA (Tabela 2) é um escore de avaliação de disfunção orgânica desenvolvido para quantificar as disfunções pulmonar,

renal, hepática, cardiovascular, hematológica e neurológica e tornar grupos de pacientes distintos comparáveis para o propósito de estudos clínicos de sepse. Quanto maior a pontuação do paciente, maior é a lesão orgânica. E, ainda mais importante do que o valor isolado do SOFA é sua avaliação seqüencial. O aumento do escore SOFA nas primeiras 48 horas de seguimento está associado à mortalidade de pelo menos 50% (Vincent et al., 1996). Recentemente o SOFA foi validado como preditor da mortalidade em pacientes submetidos a transplante de medula óssea que necessitaram de tratamento de terapia intensiva (Neumann et al., 2008). O MASCC foi calculado no início da neutropenia febril e o SOFA, neste momento e diariamente após.

Tabela 1 - MASCC (Klastersky et al, 2000)

<u>Características</u>	
Ausência de sintomas ou sintomas leves	5
Ausência de hipotensão	5
Ausência de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica	4
Tumor sólido ou ausência de infecção fúngica prévia	4
Ausência de desidratação	3
Sintomas moderados	3
Paciente ambulatorial	3
Idade < 60 anos	2

Total de pontos: 26 pontos. Baixo risco ≥ 21 ; alto risco < 21.

Tabela 2 - SOFA (Vincent et al, 1996)

<i>Pontos</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	>400	≤400	≤300	≤200 *	≤100 *
Creatinina (mg/dl) ou débito urinário	<1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9 < 500 ml/d	≥5,0 <200 ml/d
Bilirrubinas (mg/ dl)	<1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	≥12
Hipotensão	Não	PAM<70	Dopa≤5 ou Dobuta	Dopa>5 ou nora≤0,1 **	Dopa>15 ou nora** >0,1
Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	> 150	≤150	≤100	≤50	≤20
Escala de Coma de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6

*com suporte ventilatório; ** drogas adrenérgicas administradas por pelo menos 1 hora (dose em µg/Kg/min);

PAM: pressão arterial média; Dopa: dopamina; dobuta: dobutamina; nora: noradrenalina. Quanto maior o escore SOFA calculado, maior é a lesão orgânica.

3.3 - Coleta de dados clínicos e laboratoriais

Os dados clínicos foram obtidos diretamente do prontuário médico, e coletados ao longo da internação (Figura 4).

Dados clínicos:

- Nome, sexo, data de nascimento, diagnóstico, tipo de tratamento quimioterápico, tipo de transplante, status atual da doença, presença de comorbidades clínicas, duração da febre, duração da neutropenia, temperatura máxima dos picos febris, pressão arterial média (no pico febril e após 48 horas), necessidade de uso de drogas vasoativas e suporte

ventilatório, presença de foco infeccioso clinicamente determinado, evolução clínica da neutropenia febril (recuperação x óbito).

Dados laboratoriais (monitorados ao longo da internação, especialmente nas primeiras 48 horas):

- Contagem absoluta de neutrófilos, contagem de plaquetas, creatinina, bilirrubina, resultado de culturas e de exames de imagem.

Figura 4 - Ficha de coleta de dados

Paciente		HC	
Data de nascimento		Sexo	
Esquema de quimioterapia	☐ TMO autólo ☐ TMO alogênico ☐ Qtx altas doses		
Diagnóstico hematológico			
Co-morbididades			
Dia pós quimioterapia (da febre)			
Leucócitos totais (no momento da coleta)			
Neutrófilos (no momento da coleta)			
Hb/Htc (no momento da coleta)			
Plaquetas (no momento da coleta)			
Magnitude da febre (em oC)			
Tempo desde 1º pico febril (horas)			
Drogas vaso ativas?			
Sintomas da neoplasia (impacto no estado geral)	☐ nenhum ou leve ☐ moderado		
Nível de consciência			
Estado de hidratação	☐ hidratado ☐ desidratado		
Resultados da Hemocultura			
Creatinina (no momento da coleta)			
Bilirrubina (no momento da coleta)			
PA (no momento da coleta)			
DVA (no momento da coleta)			
Hipoxemia		Suporte ventilatório?	
Foco infeccioso	☐ Evidência clínica ☐ Culturas positivas ☐ Ausente		
Evolução da neutropenia febril			
Observações			
Data e hora de coleta das amostras			

Figura 4 - Representação da ficha utilizada para coleta de dados clínicos e laboratoriais

3.4 - Coleta e preparação das amostras de sangue

As primeiras amostras foram coletadas no momento da admissão na enfermaria, antes do início da quimioterapia ou do regime de condicionamento para TCPH, em todos os pacientes que preencheram os critérios de inclusão, para determinação dos níveis basais dos mediadores estudados. Amostras subsequentes foram adquiridas apenas dos pacientes que de fato evoluíram com neutropenia grave e febre e foram coletadas em dois momentos: nas primeiras 12 horas e 48 horas após o primeiro pico febril, de modo a permitir explorar a cinética dos marcadores em estudo.

As coletas foram feitas por punção venosa periférica ou através de cateter venoso central (nos pacientes com este dispositivo). As amostras foram então centrifugadas, em centrífuga refrigerada, a 8° C, 1000 x g, por 15 minutos. Todas as amostras foram submetidas ao mesmo processamento, respeitando o tempo máximo de 30 minutos entre a coleta e o início da centrifugação. O soro e o plasma obtidos por centrifugação foram imediatamente separados em alíquotas e armazenados a – 80 ° C.

3.5 - Análise dos níveis séricos de VEGF-A e sFlt-1

Os níveis séricos de VEGF-A e sFlt-1 foram medidos em duplicata por ensaio imuno-enzimático (ELISA) utilizando kits comerciais (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.6 - Análise dos níveis séricos de Ang-1 e Ang-2

Os níveis séricos de Ang-1 e Ang-2 foram medidos em duplicata por ensaio imuno-enzimático (ELISA) utilizando kits comerciais (DuoSet ELISA Development System, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.7 - Dosagem dos níveis de Fator de von Willebrand

Com o objetivo de comparar os níveis séricos de VEGF-A, sFlt-1, Ang-1 e Ang-2 com marcadores de ativação e disfunção endotelial já conhecidos, avaliamos também os níveis de Fator de von Willebrand Factor (FvW), cuja elevação foi demonstrada por outros autores em pacientes com sepse (Claus et al., 2009; Kremer Hovinga et al., 2007). Os níveis de Fator de Von Willebrand foram também medidos em duplicata em amostra de plasma anticoagulado com citrato utilizando kits comerciais (Dako Netherlands BV, Heverlee, Belgium).

3.8 - Determinação dos valores da faixa normal

Vinte indivíduos saudáveis foram utilizados como controles (10 homens e 10 mulheres, com idade mediana de 40 anos (24 – 53 anos).

3.9 - Análise estatística

A presença ou ausência de choque séptico durante o período de neutropenia foi o desfecho clínico primário usado para estratificação dos pacientes. Os dados clínicos são apresentados de forma descritiva, representados por mediana e desvio-padrão, mínimo e máximo. O teste de Mann-Whitney e o teste de Fisher foram usados para comparação entre os grupos, o primeiro para análise de variáveis contínuas e o último, de variáveis categóricas. Foi avaliada a correlação através do coeficiente de correlação de Spearman entre os escores de gravidade da sepse e as concentrações de VEGF-A, sFlt-1, Ang-1 e Ang-2. Para avaliação exploratória da acurácia diagnóstica dos testes no que diz respeito à predição da ocorrência de choque séptico, foi utilizada a curva ROC (*receiver operating characteristic*), expressa como área sob a curva ROC com intervalos de confiança de 95%, com áreas acima de 0,5 sugerindo acurácia diagnóstica. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor do P foi $\leq 0,05$.

As análises foram feitas com o software GraphPad Prism (San Diego, Califórnia, EUA) e os dados foram organizados, analisados e apresentados de acordo com as diretrizes STARD (Standards for the Reporting of Diagnostic Accuracy Studies) (Bossuyt et al., 2003) que orientam os critérios mínimos de qualidade para estudos de acurácia diagnóstica.

4 - RESULTADOS

4.1 - Características dos pacientes

Durante o período do estudo, um total de 60 pacientes admitidos na enfermaria de hematologia e na unidade de transplante de medula óssea da Unicamp foram incluídos no estudo. Destes, 41 pacientes apresentaram neutropenia febril e completaram o protocolo de investigação (Figura 5). As características destes pacientes são mostradas na Tabela 3.

Dos 41 pacientes, 10 (24,3%) evoluíram com choque séptico antes da resolução da neutropenia. O tempo mediano para a ocorrência do choque séptico após o primeiro pico febril foi de 4,1 dias (variando de 1-7 dias) e em apenas um paciente, ocorreu nas primeiras 48 horas. Comorbidades, incluindo Doença Enxerto Contra Hospedeiro Aguda, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, Hepatite pelo vírus B, Insuficiência Renal Crônica e Hipertensão Arterial, estavam presentes em 11 pacientes, dos quais 5 evoluíram com choque séptico ($p=0,09$). A contagem de neutrófilos no momento do primeiro pico febril e a duração da neutropenia não foram diferentes entre os pacientes com sepse (60 neutrófilos/ μ l; 0-290 neutrófilos/ μ l; 12 dias; 4-22 dias) e choque séptico (50 neutrófilos/ μ l; 20-470 neutrófilos/ μ l; 14 dias; 7-30 dias). Em concordância com dados da literatura, a identificação do agente infeccioso através de hemoculturas e culturas de lesão de pele e seios da face foi possível em 29% dos pacientes neutropênicos febris avaliados, predominado naqueles pacientes mais graves (Klastersky J et al., 2007). Tanto a identificação do agente infeccioso ($n=12$) como a identificação do foco ($n=10$) foi mais freqüente em pacientes com choque séptico do que naqueles com sepse não complicada ($p<0,001$ e $p<0,002$, respectivamente). Pulmão, pele, seios da face e abdome foram os sítios envolvidos. Bactérias gram-negativas (*A. baumannii*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*), bactérias gram-positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. viridans*) e fungos

(*Aspergillus e Fusarium*) foram isolados em 7, 6 e 3 pacientes respectivamente. Quatro pacientes apresentaram hemoculturas positivas para mais de um microorganismo. Não houve diferença no escore SOFA aplicado no momento da febre entre os dois grupos, mas o índice MASCC foi menor e o escore SOFA de 48 horas foi maior em pacientes com choque séptico ($P=0,02$ e $p=0,006$). Oito pacientes com choque séptico foram a óbito por complicações da sepse nos primeiros 30 dias após o início da febre (taxa de mortalidade de todos os pacientes recrutados para o estudo de 13,3 %).

Figura 5 - Fluxograma do estudo

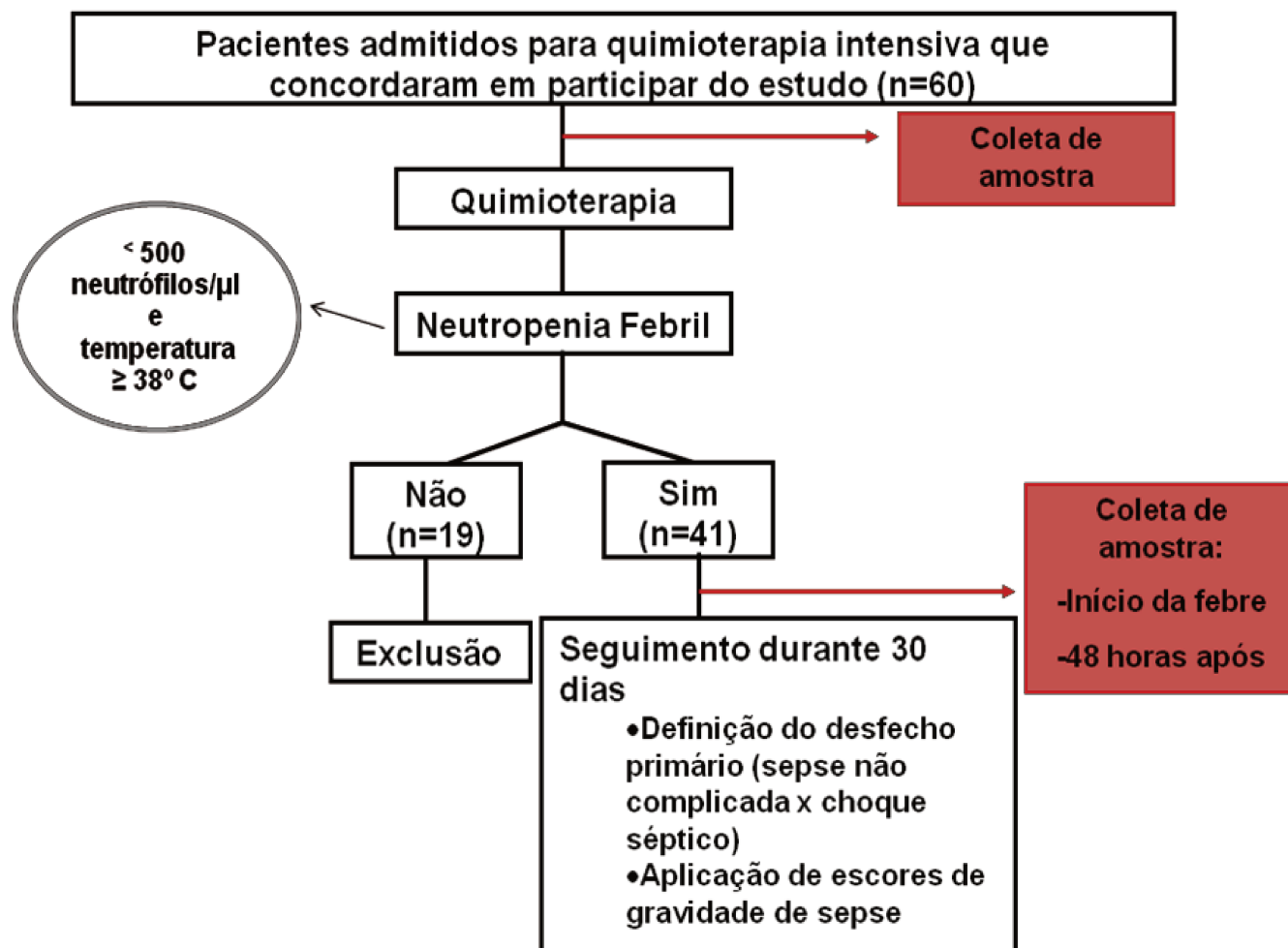


Figura 5 - Esquema ilustrativo do fluxograma do estudo

Tabela 3 - Características dos pacientes

Características	Sepse ^Ж	Choque Séptico	P
	(n=31)	(n=10)	
Sexo (masculino: feminino)	13:18	7:3	NS
Idade (mediana, min-máx)	37 (16-55)	55 (24-62)	P<0.01 *
Diagnóstico			
Leucemia Aguda	17	4	
Outras patologias [€]	14	6	
Status da doença hematológica			NS **
Remissão completa	13 (42%)	1 (10%)	
Doença Ativa	18 (58%)	9 (90%)	
Comorbidades (presente:ausente)	6:25	5:5	NS **
Tratamento			NS **
QTx intensiva /TCPH autólogo	17	6	
TCPH alogênico	14	4	
Neutrófilos/ µl - Febre (mediana, min-máx)	60 (0 - 290)	50 (20 - 470)	NS *
Dias de neutropenia (mediana, min-máx)	12 (4 - 22)	14 (7 - 30)	NS *
Plaquetas x10³/µl - Febre (mediana, min-máx)	25 (6 - 169)	38 (12 - 90)	NS *
Temperatura °C (mediana, min-máx)	38.2 (38.0-39.1)	39.0 (38.1-40.0)	P<0.01 *
Dias com febre (mediana, min-máx)	4 (1 - 12)	5 (1 - 12)	NS *
SOFA – início da febre (mediana, min-máx)	3 (0 - 7)	4 (2 - 8)	NS *
SOFA - 48 horas (mediana, min-máx)	4 (2 - 7)	7 (4 - 16)	P=0.01 *
MASCC (mediana, min-máx)	21 (16 - 23)	18 (11 - 24)	P=0.03 *
Hemocultura positiva (sim:não)	4:27	8:2	P<0.001 **

Ж Sepse não complicada; * Teste de Mann-Whitney; ** Teste de Fisher; €: Linfoma (n=8); Mieloma Múltiplo (n=5), Neoplasia Mieloproliferativa Crônica (n=5); Hemoglobininúria Paroxística Noturna (n=2); TCPH: transplante de células progenitoras hematopoiéticas; QTx: quimioterapia; FvW: Fator de Von Willebrand.

4.2 - Avaliação dos níveis séricos de VEGF-A e sFlt-1, Ang-1 e Ang-2 em indivíduos saudáveis e em pacientes portadores de neoplasia hematológica à admissão

Eventuais diferenças nas concentrações das proteínas avaliadas neste estudo presentes antes da ocorrência da febre poderiam influenciar os resultados obtidos após a ocorrência da neutropenia febril. Em tese, fatores como diagnóstico de base, status da doença (remissão x progressão), e mesmo quimioterapia prévia, poderiam influenciar de forma distinta as concentrações destes marcadores na população do estudo. Assim, com o objetivo de detectar estas possíveis influências, para que as mesmas fossem consideradas na análise dos resultados, as concentrações destes marcadores foram avaliadas em amostras coletadas imediatamente antes do início do tratamento quimioterápico. Estes resultados foram comparados com os resultados de indivíduos saudáveis, e mais importante, entre os subgrupos de pacientes que evoluíram ou não para choque séptico.

4.2.1 - sFlt-1 e VEGF-A

Os níveis de sFlt-1 foram semelhantes em indivíduos saudáveis (49,17 pg/ml; 31,01 -75,25 pg/ml) e pacientes no momento da admissão (52,89 pg/ml; 13,32-900,38 pg/ml; P=0,14). Também não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os níveis de sFlt-1 medidos à admissão entre o grupo de pacientes que evoluiu com choque séptico (58,72 pg/ml; 27,29-851,96 pg/ml) e o grupo com sepse não complicada (52,89 pg/ml; 13,32-900,38 pg/ml; P=0,99) (Tabela 4).

Devido à disponibilidade limitada de amostras no momento de realização dos testes, não foi possível a avaliação dos níveis de VEGF-A em indivíduos saudáveis e nem nos pacientes no momento da admissão, ou seja, antes da administração da quimioterapia ou de regime de condicionamento para TCPH. A ausência desta informação, no entanto, não compromete nossos resultados, pois como mostrado adiante, no início da neutropenia febril, os níveis séricos de VEGF-A foram semelhantes entre pacientes que evoluíram choque séptico e pacientes, com sepse não complicada.

Tabela 4 - Níveis de sFlt-1 em indivíduos saudáveis e pacientes portadores de neoplasia hematológica à admissão [#]

	Indivíduos Saudáveis (n=20)	Pacientes (n=41)	P*
sFlt-1 (pg/ml)	49,17 (31,01-75,25)	52,89 (13,32-900,38)	0,14
	Sepse não complicada (n=31)	Choque Séptico (n=10)	
sFlt-1 (pg/ml)	52,89 (13,32-900,38)	58,72 (27,29-851,96)	0,99

níveis dosados em amostras coletadas antes do início da quimioterapia ou do regime de condicionamento para TCPH; * teste de Mann-Whitney

4.2.2 - Ang-1 e Ang-2

Os níveis de Ang-2 foram semelhantes entre os indivíduos saudáveis (41,01 pg/ml; 19,40-246,09 pg/ml) e os pacientes à admissão (48,37 pg/ml; 18,81-2829,10 pg/ml; $P=0,88$). Não foi observada diferença nos níveis de Ang-2 medidos à admissão entre pacientes com choque séptico (26,04 pg/ml; 18,10-218,60 pg/ml) e sepse não complicada (55,22 pg/ml; 19,40-2892,10 pg/ml; $P=0,24$) (Tabela 5).

Os níveis de Ang-1 encontravam-se significativamente mais elevados nos indivíduos saudáveis (8799,70 pg/ml; 4795,10-14644,00 pg/ml) do que nos pacientes portadores de neoplasia hematológica quando medidos antes do início da quimioterapia ou do regime de condicionamento (3746,90 pg/ml; 76,43-51780,00 pg/ml; $P< 0,01$). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa dos níveis de Ang-1 à admissão entre pacientes com choque séptico (3224,00 pg/ml; 76,43-6117,50 pg/ml) e sepse não complicada (4156,60 pg/ml; 100,33-5178,00 pg/ml; $P=0,30$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Níveis de Ang-1 e Ang-2 em indivíduos saudáveis e pacientes portadores de neoplasia hematológica à admissão #

	Indivíduos Saudáveis (n=20)	Pacientes (n=41)	P*
Ang-1 (pg/ml)	8799,70 (4795,10-14644,00)	3746,90 (76,43-51780,00)	<0,01
Ang-2 (pg/ml)	41,01 (19,40-246,09)	48,37 (18,81-2892,10)	0,88
	Sepse não complicada (n=31)	Choque Séptico (n=10)	
Ang-1 (pg/ml)	4156,60 (100,33-51780,00)	3224,00 (76,43-6117,50)	0,30
Ang-2 (pg/ml)	55,22 (19,40-2892,10)	26,04 (18,10-218,60)	0,24

níveis dosados em amostras coletadas antes do início da quimioterapia ou do regime de condicionamento para TCPH; * teste de Mann-Whitney

4.3 – Avaliação dos níveis séricos de VEGF-A, sFlt-1, Ang-1 e Ang-2 em pacientes com Neutropenia Febril

4.3.1 - VEGF-A e sFlt-1

No momento do primeiro pico febril nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os níveis séricos de VEGF-A nos pacientes que evoluíram com seps não complicada (20,7 pg/ml; 7,9 a 129,3 pg/ml) e choque séptico (20 pg/ml; 9,3

a 158,9 pg/ml; $P=0.9$) (Figura 6). Após 48 horas, no entanto, as concentrações de VEGF-A foram maiores em pacientes que evoluíram com choque séptico (33,0 pg/ml; 13,0 a 241,9 pg/ml) do que naqueles com sepse não complicada (20,9 pg/ml; 5,6 a 124,4 pg/ml; $P=0.03$) (Figura 7).

De modo semelhante, embora não tenha havido diferença entre os níveis de sFlt-1 no momento da instalação da neutropenia febril entre pacientes com sepse não complicada (47,3 pg/ml; 20,8 a 117,6 pg/ml) e choque séptico (49,2 pg/ml; 29,6 a 91,1 pg/ml; $P=0.3$) (Figura 6), após 48 horas do início da febre, uma diferença marcante foi observada entre os dois grupos, com pacientes com choque séptico apresentando concentrações de sFlt-1 maiores (116,0 pg/ml; 42,7 a 208,4 pg/ml) do que os pacientes com sepse não complicada (42,9 pg/ml; 25,9 a 472,9 pg/ml; $P=0,002$) (Figura 7).

Figura 6 – Níveis séricos de VEGF-A e sFlt-1 em pacientes neutropênicos febris no início da neutropenia febril

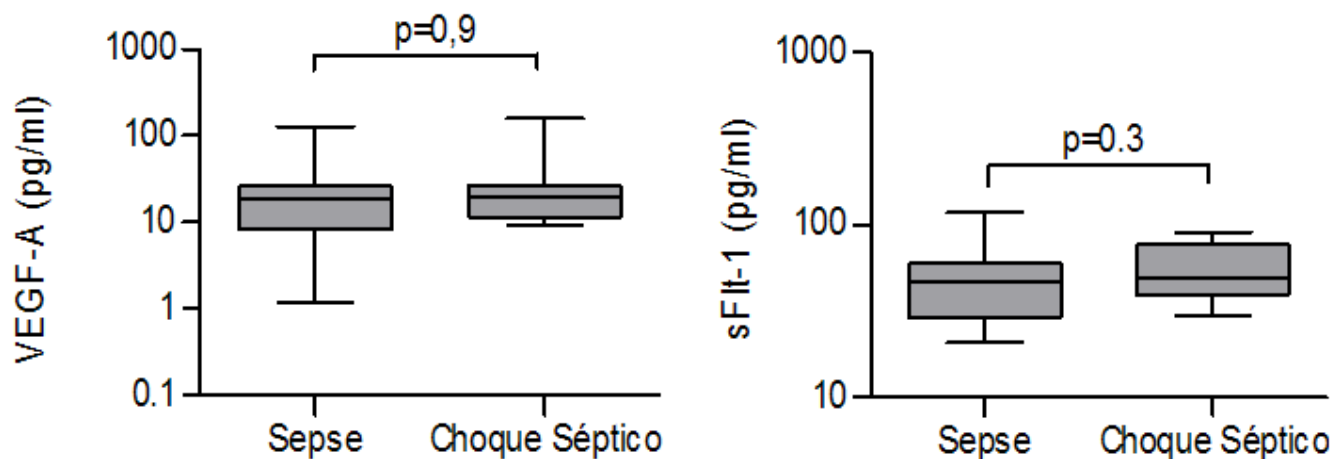


Figura 6 - Box plots representando as concentrações séricas de VEGF-A e sFlt-1 em pacientes neutropênicos febris com sepse não complicada (n=31) e choque séptico (n=10) medidas no primeiro pico febril. Teste de Mann-Whitney.

Figura 7 – Níveis séricos de VEGF-A e sFlt-1 em pacientes neutropênicos febris 48 horas após o início da neutropenia febril

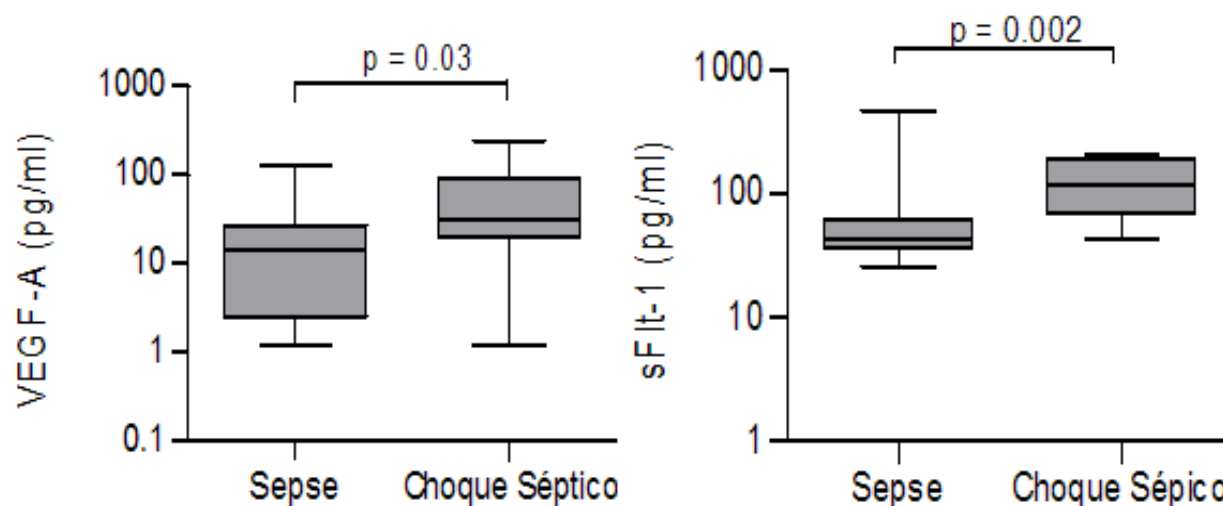


Figura 7 - Box plots representando as concentrações séricas de VEGF-A e sFlt-1 em pacientes neutropênicos febris com sepse não complicada (n=31) e choque séptico (n=10) medidas 48 horas após o primeiro pico febril. Teste de Mann-Whitney.

4.3.2 - Ang-1 e Ang-2

No início da neutropenia febril não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de Ang-1 em pacientes com sepse não complicada (185,46 g/ml; 9,30 a 3206,40 pg/ml) e choque séptico (82,34 pg/ml; 9,30 a 571,05 pg/ml; $P=0,29$) (Figura 8). Após 48 horas, as concentrações de Ang-1 permaneceram similares entre os pacientes com sepse não complicada (129,27 pg/ml; 9,30 a 8485,10 pg/ml) e choque séptico (105,10 pg/ml; 9,30 a 3510,60 pg/ml; $P=0,90$) (Figura 9).

As concentrações de Ang-2 no momento da febre também foram semelhantes entre os pacientes com sepse não complicada (105,55 pg/ml; 19,40 a 1653,50 pg/ml) e os pacientes com choque séptico (152,39 pg/ml; 19,9 a 644,27 pg/ml, $P= 0,12$) (Figura 8). Após 48 horas do primeiro pico febril, no entanto, ao contrário da Ang-1, os níveis de Ang-2 apresentavam uma diferença marcante entre os dois grupos, com níveis mais elevados em pacientes com choque séptico (840,77 pg/ml; 30,67 a 2085,30 pg/ml) em comparação aqueles com sepse não complicada (91,1 pg/ml; 19,4 a 785,24 pg/ml; $P= 0,002$) (Figura 9).

Como a Ang-1 e Ang-2 são mediadores que exercem função antagônica na permeabilidade vascular, calculamos a relação entre os seus níveis (relação Ang-2/ Ang-1) com o objetivo de detectar alterações clinicamente relevantes nas suas concentrações relativas. No início da neutropenia febril, a relação Ang-2/Ang-1 foi maior nos pacientes com choque séptico (6,8; variando 0,03 a 17,20) do que nos pacientes com sepse não complicada (0,8; variando 0,01 a 16,80; $P=0,05$) (Figura 8). Quarenta e oito horas após o início da febre, embora esta relação permanecesse maior nos pacientes que evoluíram com choque séptico (10,58; variando 0,10 a 101,70) do que nos demais pacientes (0,40; variando de 0,01 a 18,70), a diferença não manteve a significância estatística ($P= 0,06$) (Figura 9).

Figura 8 – Níveis séricos de Ang-1 e Ang-2 e Relação Ang-2/ Ang-1 em pacientes neutropênicos febris no início da neutropenia febril

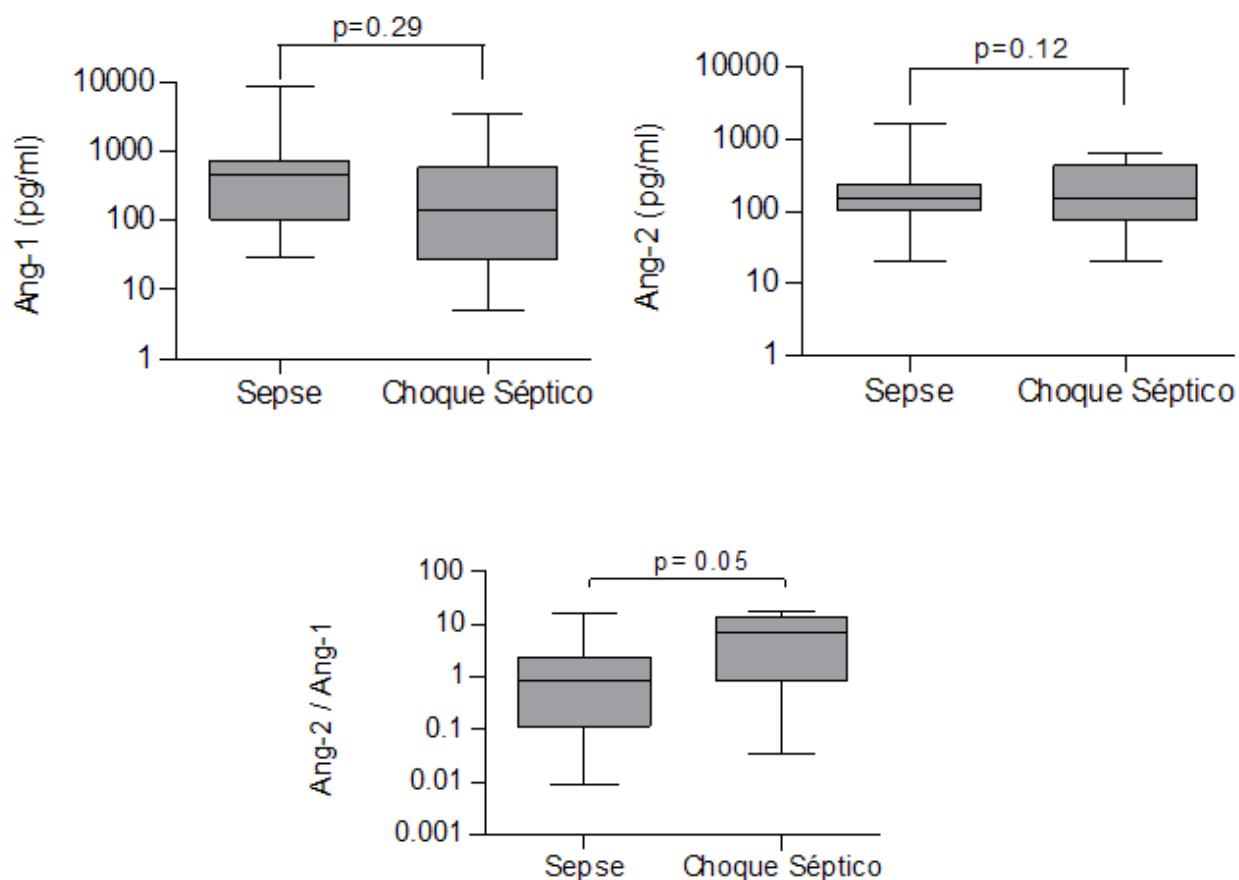


Figura 8 - Box plots representando as concentrações séricas de Ang-1 e Ang-2 e a Relação Ang-2 / Ang-1 em pacientes neutropênicos febris com sepse não complicada (n=31) e choque séptico (n=10) medidas no primeiro pico febril. Teste de Mann- Whitney.

Figura 9 – Níveis séricos de Ang-1 e Ang-2 e Relação Ang-2/ Ang-1 em pacientes neutropênicos febris 48 horas após o início da neutropenia febril

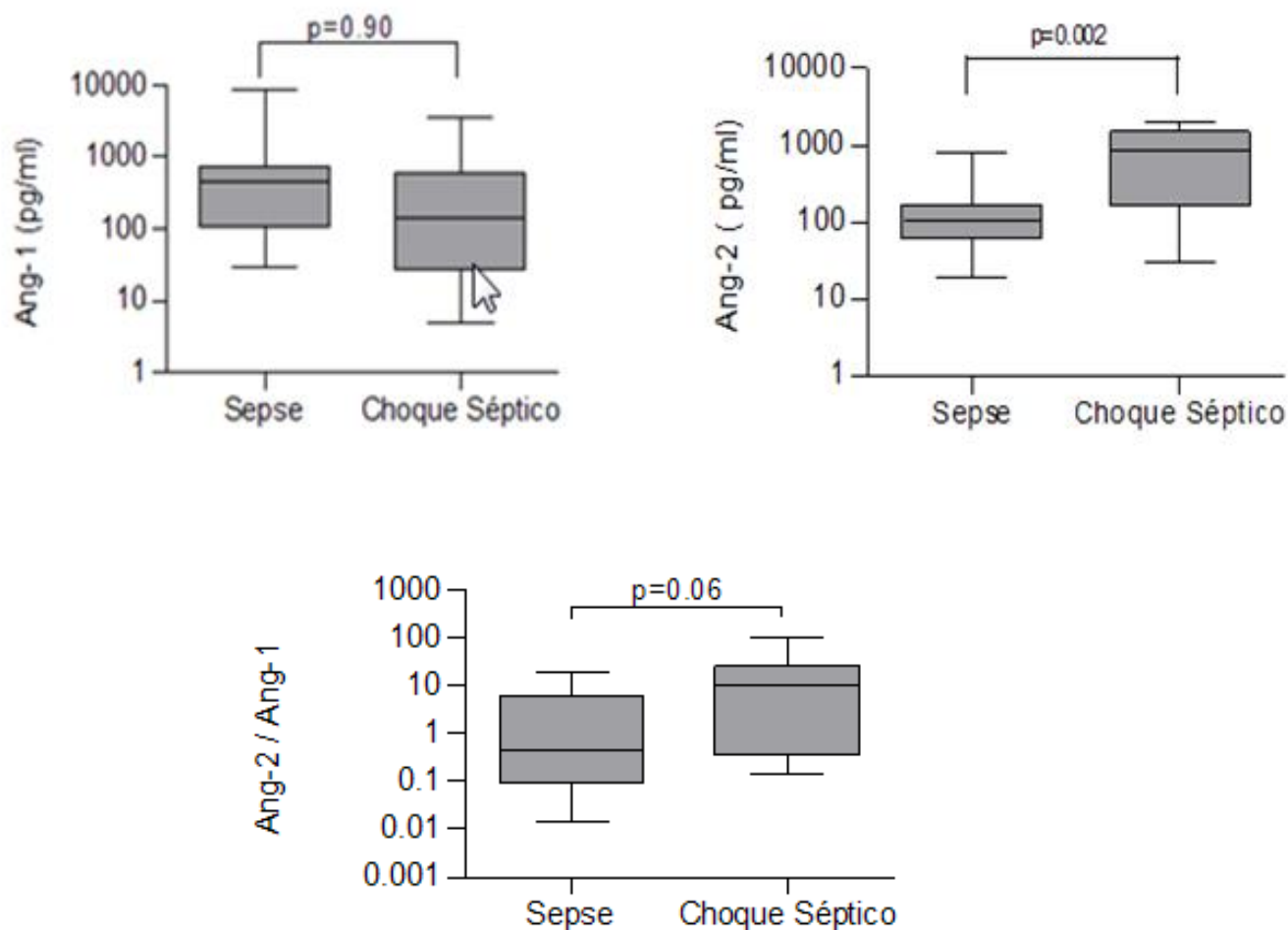


Figura 9 - Box plots representando as concentrações séricas de Ang-1 e Ang-2 e a Relação Ang-2 / Ang-1 em pacientes neutropênicos febris com sepse não complicada (n=31) e choque séptico (n=10) medidas 48 horas após o primeiro pico febril. Teste de Mann-Whitney

4.4 - Correlação entre os níveis séricos de VEGF-A, sFlt-1, Ang-1 e Ang-2 e a gravidade da sepse

Para explorar a potencial associação do VEGF-A, do sFlt-1 e das Ang-1 e Ang-2 com a gravidade da sepse nos pacientes neutropênicos febris avaliamos a correlação entre os níveis destes marcadores com os escores de gravidade da sepse. Estes incluíram o SOFA calculado 48 horas após o início da neutropenia febril e o MASCC. Não utilizamos o SOFA calculado no início da neutropenia febril, pois não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os valores deste escore entre os pacientes com sepse não complicada e aqueles com choque séptico.

4.4.1 - VEGF-A e sFlt-1

Os níveis de VEGF-A medidos no início da neutropenia febril se correlacionaram apenas com o SOFA calculado 48 horas após o início da neutropenia febril. Os níveis de sFlt-1 medidos no início da febre apresentaram correlação significativa com o SOFA calculado após 48 horas e com o MASCC (Tabela 6).

Tabela 6 - Correlação dos níveis de VEGF-A e sFlt-1 com a gravidade da sepse

	MASCC	SOFA 48 horas após
VEGF-A início NF	Rs= -0,18	Rs= 0,43
	P=0,31	P= 0,03
VEGF-A 48 horas	Rs= 0.09	Rs= -0,17
	P= 0,66	P= 0,33
sFlt-1 início NF	Rs= - 0,42	Rs= 0,32
	P< 0,01	P=0,04
sFlt-1 48 horas	Rs= -0,11	Rs= 0,25
	P= 0,52	P= 0,16

4.4.2 - Ang- 1 e Ang -2

Em relação aos níveis de Ang-1 e Ang-2, apenas os níveis de Ang-2 medidos 48 horas após o início da neutropenia apresentaram correlação com SOFA calculado neste mesmo momento. A relação Ang-2/Ang-1 medida tanto no início da neutropenia febril como 48 horas após apresentou correlação significativa com o SOFA calculado após 48 horas da febre (Tabela 7). Não foi observada correlação com o MASCC.

Tabela 7 - Correlação dos níveis de Ang-1, Ang-2 e da relação Ang-2/ Ang-1 com a gravidade da sepse

	MASCC	SOFA 48 horas após
Ang-1 início NF	Rs= -0,02	Rs= -0,09
	P= 0,91	P= 0,64
Ang-1 48 horas	Rs= 0,18	Rs= 0,20
	P= 0,37	P= 0,31
Ang-2 início NF	Rs= -0,32	Rs= 0,18
	P= 0,08	P= 0,33
Ang-2 48 horas	Rs= -0,18	Rs= 0,40
	P= 0,36	P= 0,02
Ang-2/Ang-1 início NF	Rs= -0,29	Rs= 0,51
	P= 0,07	P= 0,001
Ang-2/Ang-1 48 horas	Rs= -0,22	Rs= 0,35
	P= 0,21	P= 0,04

4.5 - Estimativa da acurácia diagnóstica dos níveis séricos de VEGF-A, sFlt-1, Ang-1 e Ang-2

A acurácia diagnóstica dos níveis de VEGF-A e sFlt-1 foi estimada usando a curva ROC na população do estudo. Quando medidos 48 horas após o início da neutropenia febril, momento em que exceto por um paciente, sinais clínicos de choque séptico ainda não estavam presentes, o VEGF-A e o sFlt-1 apresentaram valores de área sob a curva ROC de

0,76 (0,55-0,97; P=0,02) e 0,87 (0,73-1,0; P=0,002), respectivamente, o que sugere capacidade dos mesmos de discriminar os pacientes com neutropenia febril que evoluíram com choque séptico (Tabela 8).

Os valores da área sob a curva ROC dos níveis de Ang-2 medidos 48 horas após o início da neutropenia febril e da relação Ang-2/ Ang-1, no início da neutropenia febril foram, respectivamente, de 0,84 (0,65- 1,0; P=0,004) e 0,71 (0,50- 0,93; P=0,05) o que sugere a acurácia diagnóstica destas medidas. (Tabela 8).

Tabela 8 - Estimativa da acurácia diagnóstica dos níveis séricos de VEGF-A, sFlt-1, e Ang-2 e da relação Ang-2/ Ang-1

	<i>Área sob a curva ROC</i>	<i>P</i>
VEGF alto* 48 horas após o início da NF	0,76 (0,55-0,97)	0,02
sFlt-1 alto* 48 horas após o início da NF	0,87 (0,73-1,00)	0,002
Ang-2 alto* 48 horas após o início da NF	0,84 (0,65-1,00)	0,004
Relação Ang-2/Ang-1 alta* no início da NF	0,71 (0,5-0,93)	0,05

*Valores altos são aqueles maiores que o valor mediano do marcador no início da neutropenia febril (NF) e 48 horas após. Área sob a curva ROC é expressa com intervalo de confiança de 95%.

4.6 - Análise combinada dos valores de VEGF-A e sFlt-1

Em seguida avaliamos se a análise simultânea dos níveis de VEGF-A e sFlt-1 poderiam fornecer informações adicionais à análise isolada destes marcadores. Para esta análise, os níveis séricos de VEGF-A e sFlt-1 foram dicotomizados a partir dos respectivos valores medianos. Os pacientes foram então divididos em quatro grupos, conforme os valores destes marcadores (VEGF-A baixo x alto; sFlt-1 baixo x alto). Esta análise foi feita no momento da febre e após 48 horas.

No momento da febre, não parece haver diferença significativa na relação entre estes dois valores entre os grupos de pacientes que evoluíram para sepse grave x sepse não complicada. No entanto, a representação gráfica desta análise parece indicar que 48 horas após o início da febre, os pacientes do grupo que evoluiu para choque séptico tendem a se localizar nos quadrantes relativos aos níveis mais elevados de ambos os marcadores (Figura 10). A partir desta análise, pudemos determinar a estimativa de risco relativo de choque séptico nos pacientes que apresentaram tanto os níveis de VEGF-A como de sFlt-1 acima dos valores medianos, que foi de 6,9 (IC95% 1,67 -28,5; $P=0.004$) se comparado aos outros pacientes.

Figura 10 - Análise combinada dos níveis de VEGF-A e sFlt-1 em pacientes neutropênicos febris

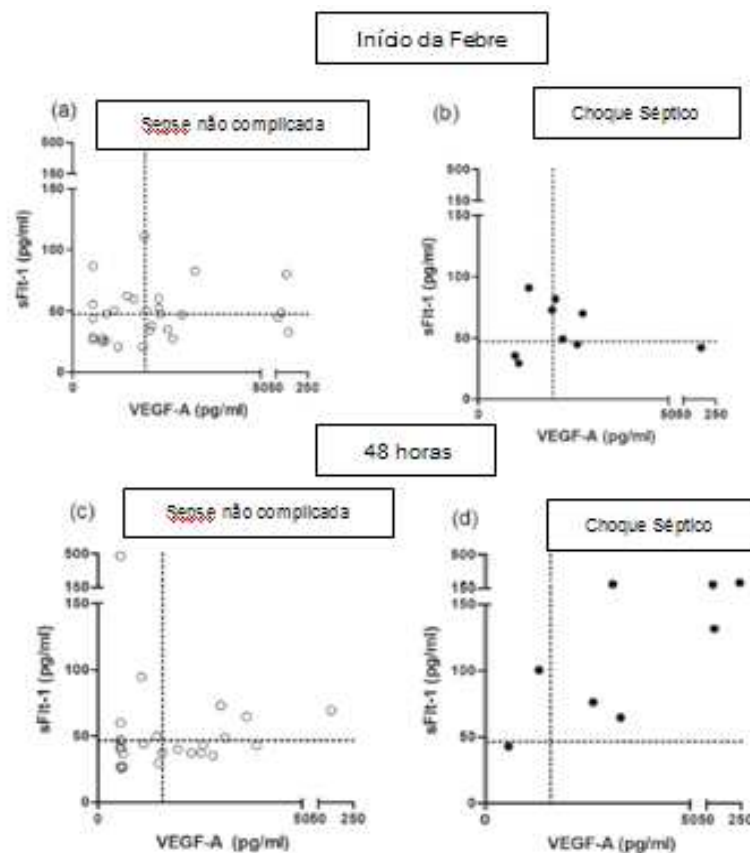


Figura 10 - Gráficos ilustrando a análise combinada de VEGF-A e sFlt-1 em pacientes com neutropenia febril. Os níveis de VEGF-A e sFlt-1 obtidos no início da neutropenia febril e 48 horas após, bem como seus valores medianos foram plotados simultaneamente. No início da febre, casos com sepse não complicada (círculos vazios) e casos com choque séptico (círculos cheios) se distribuem de maneira similar ao redor dos valores medianos (10a-b). Após 48 horas, os casos que evoluíram com choque séptico parecem se localizar mais freqüentemente no quadrante superior direito (VEGF-A e sFlt-1 altos) do que casos com sepse não complicada. Nestes últimos, os níveis desses dois marcadores se alteraram muito pouco.

4.7- Relação Ang-2/Ang-1 e a mortalidade dos pacientes com Neutropenia Febril no dia 30

Para estimar a relação entre os níveis de Ang-1 e Ang-2 nos pacientes e a mortalidade no dia 30, utilizamos a curva de Kaplan-Meier (Figura 11). Pacientes foram estratificados quanto aos valores da relação Ang-2/ Ang-1 no início da neutropenia febril. A mortalidade no dia 30 em pacientes com relação Ang-2/Ang-1 menor que o valor mediano (1,17) foi 5,5% comparado a mortalidade de 31,6% entre os pacientes com relação Ang-2/Ang-1 maior que o valor mediano ($p=0,02$).

Figura 11 – Sobrevida de pacientes com neutropenia febril de acordo com a relação Ang2/Ang-1 no início da neutropenia febril.

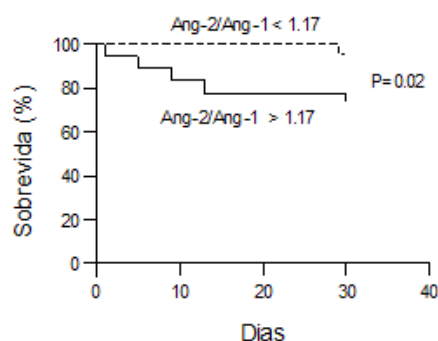


Figura 11- Curva de Kaplan-Meier ilustrando a sobrevida de pacientes onco-hematológicos neutropênicos febris de acordo com relação Ang-2/Ang-1 no início da neutropenia febril. Os valores da relação Ang-2/ Ang-1 de cada paciente foram estratificados em relação ao valor mediano da relação Ang-2/Ang-1 no início da neutropenia febril (1,17).

4.8 - Avaliação dos níveis plasmáticos de Fator de von Willebrand em pacientes com Neutropenia Febril

No momento do primeiro pico febril nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os níveis plasmáticos de FvW nos pacientes com sepse não complicada (205,12 U/ml; 88,94 a 341,95 U/ml) e choque séptico (262,72 U/ml; 208,19 a 430,09 U/ml; P=0.11) (Tabela 9). Após 48 horas, as concentrações plasmáticas de FvW permaneceram semelhantes nos pacientes com sepse não complicada (202,49 U/ml; 117,31 a 384,61 U/ml) e choque séptico (239,68 U/ml; 37,51 a 340,89 U/ml; P=0.97) (Figura 9).

Tabela 9 - Níveis plasmáticos de Fator de Von Willebrand (FvW) em pacientes portadores de neoplasia hematológica com neutropenia febril

	Sepse (n=31)	Choque Séptico (n=10)	P*
FvW no início da NF	205,12 (88,94 -341,95)	262,72 (208,19-430,09)	0,11
FvW 48 horas após início da NF	202,49 (117,31-384,61)	239,68 (37,51-340,89)	0,97

NF: neutropenia febril; * teste de Mann-Whitney

5 - DISCUSSÃO

A despeito dos avanços na terapia de suporte, a sepse e suas complicações permanecem como um dos principais desafios da medicina. Pacientes submetidos a protocolos de quimioterapia intensiva e que evoluem com neutropenia febril são particularmente susceptíveis a quadros de sepse complicada, com taxas de mortalidade variando de 10 a 41% (Cohen e Drage, 2011; Herbst et al., 2009). O risco de infecção e de sepse nestes pacientes é inversamente proporcional à contagem de neutrófilos e aumenta com a duração da neutropenia (Bodey et al., 1966). Frente à gravidade do quadro e à ausência de marcadores clínicos e laboratoriais que permitam identificar com precisão pacientes de baixo risco para complicações sépticas, a neutropenia febril é compreendida como uma emergência médica e a conduta consiste em imediata admissão hospitalar e na administração endovenosa de antibioticoterapia de amplo espectro. No entanto, foi evidenciado que o uso de antibioticoterapia oral e que a alta hospitalar precoce são medidas seguras em um grupo de pacientes estratificados como de baixo risco (Vidal et al., 2004), embora a definição precisa de paciente de baixo risco não esteja estabelecida (Phillips et al., 2003). O Índice da Associação Multinacional de Cuidados e Assistência ao Câncer (MASCC) elaborado para padronizar os critérios de neutropenia febril de baixo risco apresenta uma sensibilidade de 71% e um valor preditivo positivo de 91% para identificar pacientes neutropênicos febris de baixo risco (Kern, 2006) e é atualmente, amplamente aceito. Porém a sua utilização na definição do risco da neutropenia febril em pacientes onco-hematológicos requer cautela, pois a definição da intensidade da doença (diferenciação entre sintomas leves e moderados ou sintomas moderados e graves) é subjetiva e depende do avaliador, a doença pulmonar obstrutiva crônica é incomum entre crianças e adultos jovens e todos os pacientes onco-hematológicos perdem 4 pontos no cálculo deste índice por não terem diagnóstico de tumor sólido. Além do mais, na maioria

dos estudos desenvolvidos para avaliar a segurança do índice MASCC os pacientes onco-hematológicos representaram apenas uma pequena parcela do grupo em estudo (Klastersky et al., 2000). Frente a este cenário, a identificação de biomarcadores capazes de estratificar com segurança os pacientes onco-hematológicos com neutropenia febril de alto risco para complicações da sepse é um grande desafio. O biomarcador ideal para estratificação de risco em neutropenia febril deveria apresentar as seguintes condições: (1) detecção simples e acessível a centros de qualquer complexidade; (2) modificação precoce em amostras coletadas antes do desenvolvimento de complicações da sepse; (3) mínima influência das citopenias, doença de base, quimioterapia, e outras variáveis.

A perda da barreira endotelial apresenta um papel chave na patogênese da sepse e do choque séptico. Assim, proteínas capazes de interferir na permeabilidade endotelial representam um interessante grupo de biomarcadores potenciais de gravidade da sepse, com elevada relevância fisiopatogênica. Recentemente, a participação do VEGF-A, um fator de crescimento vascular que exerce papel crítico no controle da permeabilidade, foi demonstrada no choque séptico em pacientes internados em unidades de terapia intensiva e seus níveis foram associados com a gravidade e a mortalidade da sepse (Pickkers et al., 2005; van der Flier et al., 2005; Yano et al., 2006). Em adição, dados preliminares de estudos com animais sugerem que o sFlt-1, o receptor solúvel do VEGF-A, possa desempenhar uma função importante no tratamento da sepse, bloqueando a ação desestabilizadora do VEGF-A no endotélio (Tsao et al., 2007). Em pacientes não neutropênicos com sepse, os níveis de sFlt-1 também se mostraram elevados e apresentaram correlação com a gravidade da sepse (Shapiro et al., 2008). A regulação da permeabilidade endotelial é também influenciada pelas Ang-1 e Ang-2 e pelo seu receptor Tie2. Enquanto a ligação da Ang-1 ao Tie-2 mantém o endotélio quiescente e reduz a

permeabilidade vascular em resposta a estímulos angiogênicos e inflamatórios, a Ang-2 inibe a ligação da Ang-1 ao Tie2, desestabilizando o endotélio (Augustin et al., 2009; Maisonpierre et al., 1997; Fiedler et al., 2006). Este aspecto dinâmico da regulação da estabilidade vascular pelas angiopoietinas é fundamental durante o processo de angiogênese fisiológica (no embrião), na medida em que a quebra e remontagem da linha endotelial é fundamental para a incorporação de novas células endoteliais aos vasos primitivos (Augustin et al., 2009; Conway et al., 2001). As Ang-1 e 2 também foram associadas com a sepse e com o seu prognóstico (Giuliano et al., 2007; Kumpers et al., 2008; Kumpers et al., 2009; Parikh et al., 2006; Siner et al., 2009).

Neste estudo avaliamos os níveis séricos de VEGF-A, do sFlt-1, da Ang-1 e da Ang-2 em pacientes onco-hematológicos neutropênicos febris, no início do quadro febril e 48 horas após sua instalação, e o seu significado. Avaliamos também os níveis do Fator de von Willebrand, como um indicador de ativação e disfunção endotelial (Reinhart et al., 2002), e cuja elevação já foi demonstrada em pacientes com sepse (Claus et al., 2009; Kremer Hovinga et al., 2007). Nos pacientes onco-hematológicos neutropênicos febris avaliados, no entanto, não foi observada diferença entre os níveis plasmáticos do Fator de von Willebrand entre os pacientes que evoluíram com choque séptico e aqueles que evoluíram com sepse não complicada, o que pode estar relacionado à coleta precoce das amostras, já que nos demais estudos os níveis do Fator de von Willebrand foram dosados em amostras coletadas após o estabelecimento da sepse grave ou do choque séptico. Vale acrescentar que os níveis de VEGF-A, sFlt-1, Ang-1, Ang-2 e do Fator de Von Willebrand não apresentaram correlação com a idade dos pacientes.

Em concordância com os dados da literatura referentes a pacientes não oncológicos e não neutropênicos, nos pacientes com neutropenia febril avaliados por nós,

os níveis séricos de VEGF-A e sFlt-1 foram maiores no grupo que evoluiu com choque séptico se comparado aos pacientes com sepse não complicada, quando avaliados 48 horas após o início da febre. Além disso, estes níveis se correlacionaram com escores de gravidade da sepse, sugerindo a relevância biológica da associação estatística, e indicando que estes biomarcadores podem ser úteis na sepse. Recentemente, um estudo envolvendo 42 pacientes com neoplasia hematológica e neutropenia febril, mas dos quais apenas um paciente evoluiu com choque séptico, também avaliou a cinética do VEGF-A, encontrando resultados semelhantes. Ainda neste estudo, o VEGF-A se mostrou um melhor indicador do risco de sepse grave em pacientes neutropênicos febris do que a proteína C reativa (Hamalainen et al., 2009).

Embora o VEGF-A e o sFlt-1 tenham apresentado cinética de liberação semelhante em nossos pacientes, com elevação significativa no grupo que evoluiu com choque séptico, é possível especular que estes moduladores desempenhem papéis distintos na fisiopatologia da sepse. O sFlt-1 funciona como receptor “armadilha” para o VEGF-A, impedindo sua ligação com os receptores presentes em células endoteliais e atuando como seu antagonista. Em modelos animais de sepse, a super-expressão do sFlt-1 mediada por adenovírus, elevando suas concentrações a níveis mais de 100 vezes acima do normal foi capaz de bloquear completamente os efeitos do VEGF-A na permeabilidade endotelial, reduzindo a mortalidade da sepse experimental (Yano et al., 2006). Este achado sugere que o sFlt-1 possa ser liberado como um regulador da estabilidade endotelial em condições patológicas como a sepse. Assim, é tentador especular que níveis elevados de sFlt-1 observados no grupo de pacientes com choque séptico possam representar um mecanismo compensatório natural da sepse, desencadeado pela falência de mecanismos reguladores da permeabilidade endotelial independentes do sFlt-1. Este mecanismo compensatório teria

como objetivo a inibição do VEGF-A livre. Em nosso estudo a elevação da concentração de sFlt-1 foi bastante inferior àquela observada no estudo de Yano e colaboradores em animais (4 vezes x 100 vezes) e não foi capaz de impedir o desenvolvimento de choque séptico. A questão de se maiores elevações nas concentrações de sFlt-1 poderiam ocorrer como resposta normal do organismo, ou mesmo serem induzidas farmacologicamente, a fim de bloquear efetivamente a perda da barreira endotelial em pacientes com choque séptico permanece sem resposta até o momento.

Um outro aspecto interessante de nosso estudo que merece ser discutido diz respeito aos valores absolutos de VEGF-A e sFlt-1 observados. Em nossos pacientes, estes valores foram respectivamente, cerca de 10 e 5 vezes menores do que valores encontrados em pacientes sépticos não neutropênicos de outros estudos (Shapiro et al., 2008). As principais fontes de VEGF-A na sepse permanecem indefinidas, e não há informações sobre as fontes de sFlt-1 na sepse. Enquanto um estudo com voluntários saudáveis sugeriu que plaquetas e, principalmente, granulócitos seriam a fonte de mais de 90% do VEGF-A circulante (Kusumanto et al., 2003), em modelos de sepse em animais foram demonstrados níveis aumentados de VEGF-A no fígado, no coração e nos rins, mas nenhuma diferença pôde ser detectada entre o soro e o plasma, argumentando contra o papel das plaquetas como importante fonte de VEGF-A na sepse (Yano et al., 2006). Na medida em que uma das principais diferenças entre nossos pacientes e pacientes de outros estudos que avaliaram as concentrações de VEGF-A na sepse é a contagem de neutrófilos e plaquetas, extremamente reduzida em nossos pacientes, nossos resultados sugerem a princípio, que plaquetas e granulócitos poderiam de fato representar uma importante fonte de VEGF-A e sFlt-1 na sepse. Entretanto, a fim de explorar melhor esta hipótese, nós avaliamos a correlação dos níveis de VEGF-A e sFlt-1 com a contagem de plaquetas e granulócitos no

momento da febre e após 48 horas, e nenhuma correlação estatisticamente significativa pode ser observada. Assim, embora nossos resultados não permitam nenhuma conclusão definitiva, a ausência de correlação em dois momentos distintos sugere que plaquetas e granulócitos não sejam as principais fontes de VEGF-A e sFlt-1 na sepse.

A ausência de diferença nos níveis de VEGF-A e sFlt-1 no início da neutropenia febril entre os dois grupos de pacientes sugere que o aumento nas concentrações dos mesmos é um evento tardio na cascata inflamatória que culmina com choque séptico. Isto é sugerido também por estudos de sepse em animais e humanos, em que a indução do VEGF-A ocorreu tardiamente comparada com o TNF- α , a IL-1 e a IL-6 (Yano et al., 2006) e é consistente com a hipótese prévia de que o sFlt-1 é liberado como um mecanismo compensatório para restaurar a estabilidade vascular. É também importante salientar que nos estudos anteriores ao nosso que avaliaram a cinética de liberação do VEGF-A e do sFlt-1 em pacientes com sepse, a inclusão de pacientes ocorria após admissão em Unidades de Terapia Intensiva, quando os pacientes já apresentavam sinais evidentes de sepse grave e/ou choque séptico. O reconhecimento desta diferença é fundamental para a análise de nossos resultados, pois indica que no presente estudo a coleta de amostras ocorreu precocemente em relação ao desenvolvimento da sepse. Esta importante característica de nossa casuística pode ser comprovada pelo escore SOFA à admissão nos diferentes estudos. Este escore foi menor em nossos pacientes (mediana de 4, variando de 1 a 8) em comparação ao SOFA relatado nos estudos que avaliaram VEGF-A, sFlt-1 e angiopoietinas (mediana de 16, variando de 1 a 22) (Shapiro et al., 2008; Kumpers et al., 2008; Kumpers et al., 2009; Orfanos et al., 2007).

Quanto às angiopoietinas, embora o seu papel na patogenia do choque séptico tenha sido evidenciado em estudos com pacientes adultos e pediátricos internados em

Unidades de Terapia Intensiva, o significado das alterações destes marcadores em pacientes neutropênicos não tinha sido estudado até o momento. Da mesma forma que em pacientes não neutropênicos, em nossos pacientes os níveis de Ang-2 foram significativamente maiores entre os pacientes que evoluíram com choque séptico do que naqueles com sepse não complicada. Além disso, os níveis de Ang-2 também se correlacionaram com a gravidade da sepse (Giuliano et al., 2007; Kumpers et al., 2008; Lukasz et al., 2008). No entanto, enquanto em nossos pacientes neutropênicos febris esta diferença só pode ser observada 48 horas após o início do quadro, em pacientes não neutropênicos, ela pode ser observada no momento da inclusão nos estudos pelos outros autores (Giuliano et al., 2007; Kumpers et al., 2008; Lukasz et al., 2008). Conforme discutido anteriormente, o momento da inclusão dos pacientes nos estudos em relação à sepse (mais precoce em nossos pacientes do que nos estudos em unidades de terapia intensiva) pode explicar esta diferença. A Ang-2 fica armazenada nas células endoteliais nos corpos de Weibel-Palade e é rapidamente liberada após vários estímulos, entre os quais, leucócitos e plaquetas ativadas, citocinas, complemento, hipóxia e VEGF-A, tornando-se disponível para controlar a resposta endotelial (Augustin et al., 2009). Em um modelo de endotoxemia e sepse humana experimental, as concentrações séricas de Ang-2 se elevaram precocemente, com pico 4,5 horas após a infusão de lipopolissacarídeo, exibindo cinética similar a do TNF- α , da IL-6 e da IL-8 (Kumpers et al., 2009).

À semelhança de estudos prévios, não detectamos diferenças significativas nos níveis de Ang-1 entre os dois grupos de pacientes, bem como correlação entre esta e a gravidade da sepse (Giuliano et al., 2007; Kumpers et al., 2008). Estes resultados podem em parte dever-se ao fato da Ang-1 ser produzida e liberada constitutivamente, ao contrário da Ang-2 (Augustin et al., 2009). Quando as concentrações relativas da Ang-1 e da Ang-2

foram avaliadas através da relação Ang-2/ Ang-1, foi observado uma deficiência relativa da Ang-1 em relação à Ang-2 nos pacientes que evoluíram com choque séptico. Esta deficiência estava presente precocemente, já no início da neutropenia febril, confirmando resultado observado com crianças, em que aquelas com choque séptico apresentaram aumento significativo da relação Ang-2/Ang-1 em comparação às crianças com sepse sem choque (Giuliano et al., 2007). A cinética desta relação também se comportou de maneira diferente nos dois grupos de pacientes. Nos pacientes neutropênicos febris que evoluíram com choque séptico, houve um aumento desta relação de aproximadamente 10 vezes e naqueles com sepse não complicada, uma diminuição de 0,4, mostrando uma tendência divergente nas concentrações relativas destes marcadores em pacientes com sepse complicada x sepse não complicada. Além disso, a relação Ang-2/Ang-1 apresentou correlação significativa com a gravidade da sepse e com a mortalidade no dia 30 corroborando a relevância clínica da associação estatística observada. Estes dados sugerem que a relação dos níveis séricos destas duas angiopoietinas possa ser mais informativa do que suas concentrações isoladas, o que se justifica por suas ações antagônicas (Augustin et al., 2009). Este antagonismo fica evidente a partir de um estudo que demonstrou que a capacidade do soro de pacientes com sepse de desestabilizar a barreira endotelial se correlaciona com os níveis de Ang-2. Além disso, os autores demonstraram que esta capacidade pode ser revertida pela adição de Ang-1 (Parikh et al., 2006).

Como descrito para o VEGF-A e para o sFlt-1, o valor absoluto das concentrações séricas de Ang-1 e Ang-2 também foram inferiores, aproximadamente 10 vezes, aos descritos em pacientes sépticos não neutropênicos. Assim como no caso do VEGF-A e sFlt-1, não observamos correlação entre os valores de Ang-1 e Ang-2 com contagem plaquetária e de granulócitos.

A estimativa da acurácia diagnóstica do VEGF-A, do sFlt-1 e da Ang-2 medidos 48 horas após o início da neutropenia febril e da relação Ang-2/ Ang-1 calculada no início da febre apresentou resultados promissores, especialmente para o sFlt-1. Porém estudos com maior número de pacientes e sob condições menos controladas a fim de reproduzir o que acontece na prática médica, com a inclusão de pacientes onco-hematológicos em tratamento ambulatorial, devem ser realizados para confirmar a utilidade dos mesmos como biomarcadores da sepse.

6 - CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos propostos neste estudo, concluímos que:

- Os níveis séricos de VEGF-A, sFlt-1 e Ang-2 medidos 48h após o primeiro pico febril encontram-se significativamente aumentados em pacientes com neutropenia febril que evoluem para choque séptico quando comparados com pacientes que apresentam neutropenia febril e sepse não complicada.

- A relação Ang-2/Ang-1 no soro medida no momento do primeiro pico febril encontra-se significativamente aumentada em pacientes com neutropenia febril que evoluem para choque séptico quando comparada com pacientes que apresentam neutropenia febril e sepse não complicada.

- Os níveis séricos de VEGF-A, sFlt-1 e Ang-2 apresentam correlação estatística significativa com escores de gravidade de neutropenia febril e sepse.

- A determinação da relação Ang-2/Ang-1 no momento do primeiro pico febril, bem como a dosagem da VEGF-A, sFlt-1 e Ang-2 48 horas após o primeiro pico febril apresentam potencial de uso como biomarcador de gravidade em pacientes com neutropenia febril, conforme evidenciado pela análise formal de acurácia diagnóstica.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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; 101 (6): 1644-55.

Marshall JC, Reinhart K. Biomarkers of sepsis. Crit Care Med 2009; 37(7):2290-8.

Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. Intensive Care Med 2000; 26 Suppl 1: S64-74.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med 2001; 29 (7): 1303-10.

Silva E, Pedro M de A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). Crit Care 2004; 8 (4): R251-60.

Williams MD, Braun LA, Cooper LM, Johnston J, Weiss RV, Qualy RL et al. Hospitalized cancer patients with severe sepsis: analysis of incidence, mortality, and associated costs of care. Crit Care 2004; 8 (5): R291-8.

O'Brien JM, Jr., Ali NA, Aberegg SK, Abraham E. Sepsis. Am J Med 2007; 120 (12): 1012-22.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature 2002; 420 (6917): 885-91.

Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. Blood 2003; 101 (10): 3765-77.

Lolis E, Bucala R. Therapeutic approaches to innate immunity: severe sepsis and septic shock. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2 (8): 635-45.

Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *Jama* 1995; 273 (2): 117-23.

Angus DC, Birmingham MC, Balk RA, Scannon PJ, Collins D, Kruse JA et al. E5 murine monoclonal antiendotoxin antibody in gram-negative sepsis: a randomized controlled trial. E5 Study Investigators. *Jama* 2000; 283 (13): 1723-30.

Webster NR, Galley HF. Immunomodulation in the critically ill. *Br J Anaesth* 2009; 103 (1): 70-81.

van der Poll T, van Deventer SJ. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 1999; 13 (2): 413-26, ix.

Hack CE, Zeerleder S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med* 2001; 29 (7 Suppl): S21-7.

Spronk PE, Zandstra DF, Ince C. Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. *Crit Care* 2004; 8 (6): 462-8.

Murakami M, Simons M. Regulation of vascular integrity. *J Mol Med* 2009; 87 (6): 571-82.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219 (4587): 983-5.

Ferrara N, Gerber HP, Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9 (6): 669-76.

Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005; 9 (4): 777-94.

Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol* 2006; 8(11):1223-34.

Pickkers P, Sprong T, Eijk L, Hoeven H, Smits P, Deuren M. Vascular endothelial growth factor is increased during the first 48 hours of human septic shock and correlates with vascular permeability. *Shock* 2005; 24 (6): 508-12.

van der Flier M, van Leeuwen HJ, van Kessel KP, Kimpen JL, Hoepelman AI, Geelen SP. Plasma vascular endothelial growth factor in severe sepsis. *Shock* 2005; 23 (1): 35-8.

Shapiro NI, Yano K, Okada H, Fischer C, Howell M, Spokes KC et al. A prospective, observational study of soluble FLT-1 and vascular endothelial growth factor in sepsis. *Shock* 2008; 29 (4): 452-7.

Yano K, Liaw PC, Mullington JM, Shih SC, Okada H, Bodyak N et al. Vascular endothelial growth factor is an important determinant of sepsis morbidity and mortality. *J Exp Med* 2006; 203 (6): 1447-58.

Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10 (3): 165-77.

Thomas M, Augustin HG. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* 2009; 12 (2): 125-37.

Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001; 49 (3): 507-21.

Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD et al. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1999; 286 (5449): 2511-4.

Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD et al. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 2000; 6 (4): 460-3.

Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277 (5322): 55-60.

Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G et al. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF- α and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* 2006; 12 (2): 235-9.

Witzenbichler B, Westermann D, Knueppel S, Schultheiss HP, Tschope C. Protective role of angiopoietin-1 in endotoxic shock. *Circulation* 2005; 111 (1): 97-105.

Giuliano JS, Jr., Lahni PM, Harmon K, Wong HR, Doughty LA, Carcillo JA et al. Admission angiopoietin levels in children with septic shock. *Shock* 2007; 28 (6): 650-654.

Kumpers P, Lukasz A, David S, Horn R, Hafer C, Faulhaber-Walter R et al. Excess circulating angiopoietin-2 is a strong predictor of mortality in critically ill medical patients. Crit Care 2008; 12 (6): R147.

Kumpers P, van Meurs M, David S, Molema G, Bijzet J, Lukasz A et al. Time course of angiopoietin-2 release during experimental human endotoxemia and sepsis. Crit Care 2009; 13 (3): R64.

Parikh SM, Mammoto T, Schultz A, Yuan HT, Christiani D, Karumanchi SA et al. Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans. PLoS Med 2006; 3 (3): e46.

Siner JM, Bhandari V, Engle KM, Elias JA, Siegel MD. Elevated serum angiopoietin 2 levels are associated with increased mortality in sepsis. Shock 2009; 31 (4): 348-53.

Morrison VA. An overview of the management of infection and febrile neutropenia in patients with cancer. Support Cancer Ther 2005; 2 (2): 88-94.

Bodey GP, Buckley M, Sathe YS, Freireich EJ. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. Ann Intern Med 1966; 64 (2): 328-40.

Pizzo PA. Management of fever in patients with cancer and treatment-induced neutropenia. N Engl J Med 1993; 328 (18): 1323-32.

Klastersky J, Ameye L, Maertens J, Georgala A, Muanza F, Aoun M et al. Bacteraemia in febrile neutropenic cancer patients. Int J Antimicrob Agents 2007; 30 Suppl 1: S51-9.

Sudhoff T, Giagounidis A, Karthaus M. Evaluation of neutropenic fever: value of serum and plasma parameters in clinical practice. *Chemotherapy* 2000; 46 (2): 77-85.

Cohen J, Drage S. How I manage haematology patients with septic shock. *Br J Haematol* 2011; 152 (4): 380-91.

Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, Bow EJ, Brown AE, Calandra T et al. 2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis* 2002; 34 (6): 730-51.

Klastersky J, Paesmans M, Rubenstein EB, Boyer M, Elting L, Feld R et al. The Multinational Association for Supportive Care in Cancer risk index: A multinational scoring system for identifying low-risk febrile neutropenic cancer patients. *J Clin Oncol* 2000; 18 (16): 3038-51.

Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H 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 (7): 707-10.

Neumann F, Lobitz O, Fenk R, Bruns I, Kosterling M, Steiner S et al. The sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) score is predictive for survival of patients admitted to the intensive care unit following allogeneic blood stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2008; 87 (4): 299-304.

Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM et al. [Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative.]. *Dtsch Med Wochenschr* 2003; 136 (15): e24.

Herbst C, Naumann F, Kruse EB, Monsef I, Bohlius J, Schulz H et al. Prophylactic antibiotics or G-CSF for the prevention of infections and improvement of survival in cancer patients undergoing chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; (1): CD007107.

Vidal L, Paul M, Ben-Dor I, Pokroy E, Soares-Weiser K, Leibovici L. Oral versus intravenous antibiotic treatment for febrile neutropenia in cancer patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; (4): CD003992.

Phillips B, Wade R, Stewart LA, Sutton AJ. Systematic review and meta-analysis of the discriminatory performance of risk prediction rules in febrile neutropaenic episodes in children and young people. *Eur J Cancer* 2003; 46 (16): 2950-64.

Kern WV. Risk assessment and treatment of low-risk patients with febrile neutropenia. *Clin Infect Dis* 2006; 42 (4): 533-40.

Tsao PN, Chan FT, Wei SC, Hsieh WS, Chou HC, Su YN et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 protects mice in sepsis. *Crit Care Med* 2007; 35 (8): 1955-60.

Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, Meisner M. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit Care Med* 2002; 30 (5 Suppl): S302-12.

Claus RA, Bockmeyer CL, Budde U, Kentouche K, Sossdorf M, Hilberg T et al. Variations in the ratio between von Willebrand factor and its cleaving protease during systemic inflammation and association with severity and prognosis of organ failure. *Thromb Haemost* 2009; 101 (2): 239-47.

Kremer Hovinga JA, Zeerleder S, Kessler P, Romani de Wit T, van Mourik JA, Hack CE et al. ADAMTS-13, von Willebrand factor and related parameters in severe sepsis and septic shock. *J Thromb Haemost* 2007; 5 (11): 2284-90.

Hamalainen S, Juutilainen A, Matinlauri I, Kuittinen T, Ruokonen E, Koivula I et al. Serum vascular endothelial growth factor in adult haematological patients with neutropenic fever: a comparison with C-reactive protein. *Eur J Haematol* 2009; 83 (3): 251-7.

Kusumanto YH, Dam WA, Hospers GA, Meijer C, Mulder NH. Platelets and granulocytes, in particular the neutrophils, form important compartments for circulating vascular endothelial growth factor. *Angiogenesis* 2003; 6 (4): 283-7.

Orfanos SE, Kotanidou A, Glynos C, Athanasiou C, Tsigkos S, Dimopoulou I et al. Angiopoietin-2 is increased in severe sepsis: correlation with inflammatory mediators. *Crit Care Med* 2007; 35 (1): 199-206.

Lukasz A, Hellpap J, Horn R, Kielstein JT, David S, Haller H et al. Circulating angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in critically ill patients: development and clinical application of two new immunoassays. *Crit Care* 2008; 12 (4): R94.

8 - APÊNDICES

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Imbalances in serum angiopoietin concentrations are early predictors of septic shock development in patients with post chemotherapy febrile neutropenia

Brunna E Alves¹, Silmara AL Montalvao¹, Franciso JP Aranha¹, Tania FG Siegl¹, Carmino A Souza², Irene Lorand-Metze², Joyce M Annichino-Bizzacchi² and Erich V De Paula^{*1}

Abstract

Background: Febrile neutropenia carries a high risk of sepsis complications, and the identification of biomarkers capable to identify high risk patients is a great challenge. Angiopoietins (Ang -) are cytokines involved in the control microvascular permeability. It is accepted that Ang-1 expression maintains endothelial barrier integrity, and that Ang-2 acts as an antagonizing cytokine with barrier-disrupting functions in inflammatory situations. Ang-2 levels have been recently correlated with sepsis mortality in intensive care units.

Methods: We prospectively evaluated concentrations of Ang-1 and Ang-2 at different time-points during febrile neutropenia, and explored the diagnostic accuracy of these mediators as potential predictors of poor outcome in this clinical setting before the development of sepsis complications.

Results: Patients that evolved with septic shock (n = 10) presented higher levels of Ang-2 measured 48 hours after fever onset, and of the Ang-2/Ang-1 ratio at the time of fever onset compared to patients with non-complicated sepsis (n = 31). These levels correlated with sepsis severity scores.

Conclusions: Our data suggest that imbalances in the concentrations of Ang-1 and Ang-2 are independent and early markers of the risk of developing septic shock and of sepsis mortality in febrile neutropenia, and larger studies are warranted to validate their clinical usefulness. Therapeutic strategies that manipulate this Ang-2/Ang-1 imbalance can potentially offer new and promising treatments for sepsis in febrile neutropenia.

Background

Despite improvements in supportive care, sepsis remains the most common cause of death in intensive care units, with mortality rates of 30% to 50 [1,2]. Recently, therapies targeting elements from the inflammatory and coagulation cascades yielded disappointing results in clinical trials [3-5], possibly due to redundancy within the inflammatory pathways activated during sepsis. Endothelial barrier disruption plays a key role in the pathogenesis of sepsis and septic shock, making it an attractive target for studies aimed to identify new therapeutic targets for

sepsis [6]. Recently, the participation of VEGF, a vascular growth factor with potent microvascular permeability functions, in the pathogenesis of septic shock was demonstrated [7]. Another important regulator of endothelial barrier function are the angiopoietins (Ang) -1 and -2, and the tyrosine kinase receptor Tie2 expressed in endothelial cells. Binding of Ang-1 to Tie2 maintains the quiescent resting state of the endothelium and reduces vascular permeability in response to inflammatory stimuli. In contrast, Ang-2 inhibits binding of Ang-1 to Tie2, resulting in vessel destabilization [8-10]. Circulating levels of Ang-1 and Ang-2 have been recently evaluated in patients with sepsis, and levels of Ang-2 have been correlated with sepsis severity in children [11] and adults [12-

* Correspondence: erich@unicamp.br

¹ Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article



© 2010 Alves et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

15], when evaluated in patients admitted to intensive care units with established signs and symptoms of sepsis.

Febrile neutropenia (FN) in patients with hematologic malignancies is characterized by increased susceptibility to sepsis complications, and a higher risk of septic shock, with mortality ranging from 2-21% [16]. Most patients with FN are well at the time of fever onset. However, ways to predict the development of fulminant sepsis and septic shock is a great challenge in the care of these patients [17,18]. Here we evaluated the time-course of Ang-1 and Ang-2 expression in FN patients early in the course of sepsis and explored the diagnostic accuracy of Ang-1 and Ang-2 levels as potential predictors of poor outcome in this clinical setting.

Methods

Patient's eligibility criteria

Recruitment of patients took place at the Bone Marrow Transplantation Unit of University of Campinas between March 2008 and March 2009. Patients were included if they fulfilled the following criteria: (1) diagnosis of hematological malignancies, and (2) admission as inpatients for intensive chemotherapy (induction for acute leukemia or high-dose sequential therapy for lymphomas) or hematopoietic stem-cell transplantation (HSCT). Patients were invited to participate before the initiation of any chemotherapy regimen. Fever ($T \geq 38.0^\circ\text{C}$) at admission was the only exclusion criteria. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the local Ethics Committee. Informed written consent was obtained from all patients prior to collection of samples. Only patients that presented fever during neutropenia (defined as a neutrophil count $<500 \mu\text{l}$) were included in the second phase of the study. Descriptive data consisting of demographics, diagnosis, clinical data, and disease severity scores were obtained from the medical records. Twenty healthy individuals volunteered to determine a normal reference range for Ang-1 and Ang-2 levels (10 males, 10 females; median age 40 - range 24 to 53).

Sepsis definitions and risk stratification scores

An infectious etiology was assumed for all patients with post chemotherapy neutropenia with new onset fever, in accordance with FN management protocols. Blood and urine cultures were immediately obtained and broad-spectrum antibiotics were initiated [19]. Sepsis, in this population, was defined by the presence of two or more of the following: (1) temperature $> 38.0^\circ\text{C}$, (2) heart rate >90 beats/min, (3) respiratory rate > 20 breaths/min or $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg, and a microbiologically proven or clinically evident source of infection. Septic shock was present in patients in which sepsis was complicated with hypoperfusion or hypotension (systolic arterial pressure

<90 mmHg or a reduction in systolic blood pressure of >40 mmHg from baseline), despite adequate volume resuscitation. Patients were subdivided into two outcome groups: sepsis (non-complicated) and septic shock. Severity of illness was assessed by calculating the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score [20] daily after the development of fever, and by calculation of the Multinational Association for Supportive Care In Cancer (MASCC) score at the time of fever [21,22].

Laboratory measurements

Venous blood was drawn at enrollment (baseline), within 12 hours after first episode of neutropenic fever, and 48 hours thereafter. Samples were immediately centrifuged at 3000 rpm (4°C , 20 mins) and plasma and serum was stored at -80°C until analysis. Samples were processed by the same investigator. Serum levels of Ang-1 and Ang-2 were measured in duplicate using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. Interassay coefficient of variations were 2.95% for Ang-1 and 6.87% for Ang-2 samples with concentrations within the range observed in our study. Von Willebrand Factor (VWF) levels were measured in duplicate in citrate plasma samples using a rabbit anti-human VWF peroxidase conjugate (Dako Netherlands BV, Heverlee, Belgium).

Statistical Analysis

Patients were divided in two outcome subgroups according to the presence of absence of septic shock at any time point before the resolution of FN. Differences in continuous variables between patients from each subgroup, and between patients and healthy controls were analyzed using the Mann-Whitney rank sum test. Categorical variables were compared using the Fisher's exact test. Data are expressed as median and range unless otherwise stated. Correlation (Spearman's rank correlation) and linear regression analysis were performed between sepsis severity scores and angiopoietin concentrations. Receiver operator characteristics (ROC) procedures were used to identify optimal cut-off values of angiopoietin concentrations to differentiate patients with non-complicated sepsis and patients with septic shock. A second analysis was performed to explore the effect of angiopoietin concentrations on 30-day mortality, calculated from the day of fever onset. Survival curves were estimated using the Kaplan-Meier method. Parameters independently associated with survival were identified by univariate and multivariate Cox proportional hazards models. Variables found to be statistically significant at a 10% level in the univariate analyses were included in the multivariate model. Different models were established, and variable selection was performed by different forward and back-

ward procedures, with comparable results. A *p* value less than or equal to 0.05 was considered statistically significant. All statistical analysis were performed with the SPSS package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and the GraphPad Prism Software (GraphPad Prism Software Inc. San Diego, California, USA).

Results

Patients Characteristics

A total of 60 patients fulfilled the primary criteria for study entry, of which 41 patients experienced neutropenic fever and completed the study (Figure 1). Characteristics of these patients are shown in Table 1. In 10/41 patients (24%), septic shock was present before the resolution of neutropenia, and all of them required mechanical ventilation. The median time to the development of septic shock was 4.1 days (range 1 - 7 days) after the first episode of neutropenic fever, and in only one patient, septic shock onset occurred in the first 48 hours after the first episode of neutropenic fever. Eight patients died within the first 30 days after the onset of fever, reaching a 30-day mortality of 13.3%. All deaths were attributed to complications of septic shock. The only clinical significant difference between patients with non-complicated sepsis and septic shock were: (1) age, (2) presence of bloodstream infection, (3) sepsis severity score SOFA calculated 48 hours after fever onset, and (4) MASCC at the time of neutropenic fever. An anatomic site of infection was established in 10 (24%) patients. Compared to healthy individuals, patients presented lower baseline levels of Ang-1, and similar baseline levels of Ang-2 (Table 2).

Time-course of Ang-1 serum levels in hematological patients with FN

At baseline, no difference in Ang-1 levels could be observed between patients with non-complicated sepsis and with septic shock (Table 2). No statistical significant difference could be detected between Ang-1 levels in patients with non-complicated sepsis (185.46 pg/ml, range 9.30-3206.40 pg/ml) or with septic shock (82.34 pg/ml, range 9.30-571.05 pg/ml; Mann-Whitney test, *p* = 0.29) at the time of fever onset. After 48 hours, Ang-1 levels remained similar in patients with non-complicated sepsis (129.27 pg/ml, range 9.30-8485.10 pg/ml) and in patients with septic shock (105.10 pg/ml, range 9.30-3510.60 pg/ml; Mann-Whitney test, *p* = 0.90) (Figure 2).

Time-course of Ang-2 serum levels in hematological patients with FN

At baseline, no statistically significant difference could be observed in levels of Ang-2 between patients from the two groups (Table 2). Furthermore, Ang-2 levels were

similar at the time of neutropenic fever between patients with non-complicated sepsis (105.55 pg/ml, range 19.40-1653.50 pg/ml) and septic shock (152.39 pg/ml, range 19.97-644.27 pg/ml). However, 48 hours after neutropenic fever a striking difference could be observed between patients with and without septic shock, with markedly increased Ang-2 concentrations in patients with septic shock (840.77 pg/ml, range 30.67-2085.30 pg/ml) compared to patients with non-complicated sepsis (91.10 pg/ml, range 19.40-785.24 pg/ml; Mann-Whitney test: *p* = 0.002) (Figure 2). We estimated the diagnostic accuracy of Ang-2 levels measured 48 hours after fever onset. Ang-2 48 hours after fever onset yielded an area under the ROC curve of 0.84 (95%CI = 0.65-1.0; *P* = 0.004). In our population, an optimal cut-off value of Ang-2 > 233 pg/ml predicted the development of septic shock with a sensitivity of 75% (95%CI = 34.9%-96.8%) and a specificity of 92.6% (95%CI = 75.7%-99.1%).

The Ang-2/Ang-1 ratio is increased in FN patients that evolve to septic shock

The Ang-2/Ang-1 ratio was calculated in an effort to detect relevant changes in the relative concentration of these two antagonistic mediators of microvascular permeability. At the time of neutropenic fever, the Ang-2/Ang-1 ratio was much higher in patients with septic shock (6.80, range 0.03-17.20) compared to patients with non-complicated sepsis (0.80, range 0.01-16.8; Mann-Whitney test: *p* = 0.05). After 48 hours, the Ang-2/Ang-1 ratio was higher in patients that developed septic shock (10.58, range 0.10-101.70) compared to patients with non-complicated sepsis (0.40, range 0.01-18.70), but statistical significance was not reached (Mann-Whitney test: *P* = 0.06) (Figure 2). Estimation of the diagnostic accuracy of the Ang-2/Ang-1 ratio at fever onset yielded an area under the ROC curve of 0.71 (95%CI = 0.50-0.93; *P* = 0.05). In our population, a median Ang-2/Ang-1 ratio of 1.17, which was the optimal cut-off value identified by the ROC procedure, predicted the development of septic shock with a sensitivity of 77.8% (95%CI = 40.0%-97.2%) and a specificity of 60% (95% CI = 40.6%-77.3%).

Serum Ang-1 and Ang-2 levels correlate with severity of illness score (SOFA)

We next evaluated whether serum Ang-1 and Ang-2 levels correlated with the SOFA score. We utilized the SOFA score calculated 48 hours after fever because it segregates each outcome group better than SOFA at the time of fever onset (Table 1). Significant correlations were observed between SOFA and the following parameters: Ang-2 48 h after fever (*R*s = 0.40; *P* = 0.02), Ang-2/Ang-1 ratio at fever onset (*R*s = 0.51; *P* = 0.001) and Ang-2/Ang-1 ratio 48 h after fever (*R*s = 0.35; *P* = 0.04) (Figure 3).

Table 1: Patient characteristics

Characteristics	Sepsis ¶ (n = 31)	Septic shock (n = 10)	P
Sex (male:female)	13:18	7:3	0.16 **
Age (median, range)	37 (16-55)	55 (24-62)	P < 0.01 *
Diagnosis			
Acute leukemias	17	4	
Other €	14	6	
Disease status			
Complete remission	13 (42%)	1 (10%)	0.12 **
Active disease	18 (58%)	9 (90%)	
Treatment			
Intensive CTx/autologous HSCT	17	6	0.48 **
Allogeneic HSCT	14	4	
Neutrophils/µl - Fever (median, range)	60 (0 - 290)	50 (20 - 470)	0.40 *
Days of neutropenia (median, range)	12 (4 - 22)	14 (7 - 30)	0.36 *
Platelets × 103/µl - fever (median, range)	25 (6 - 169)	38 (12 - 90)	0.16 *
Days with fever (median, range)	4 (1 - 12)	5 (1 - 12)	0.65 *
SOFA score - fever onset (median, range)	3 (0 - 7)	4 (2 - 8)	0.31 *
SOFA score - 48 hours (median, range)	4 (2 - 7)	7 (4 - 16)	P = 0.01 *
MASCC score (median, range)	21 (16 - 23)	18 (11 - 24)	P = 0.03 *
Agent isolation in bloodstream (yes:no) £	4:27	8:2	P < 0.001 **
Von Willebrand Factor U/ml - fever (median, range)	205.12(88.94 - 341.95)	262.72 (208.19-430.09)	0.11 *

¶ Non-complicated sepsis; *Mann-Whitney test; **Fisher's exact test; €: Lymphoma (n = 8); Multiple Myeloma (n = 5); Myeloproliferative diseases (n = 5); Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (n = 2); HSCT: Hematopoietic stem cell transplantation; CTx: chemotherapy. £: Gram negative: n = 7; Gram positive: 7; Fungi: n = 2 (4 patients with mixed flora infections).

Ang-2/Ang-1 ratio at fever onset and 30-day mortality in patients with FN

To determine the relationship of angiopoietin levels with 30-day mortality, we initially performed univariate Cox proportional hazards analysis, in which the following variables were found to be statistically significant: age, duration of neutropenia, SOFA, MASCC, Ang-2 (48 hours after fever) and Ang-2/Ang-1 ratio (both at fever onset and 48 hours thereafter). We then performed multivariate Cox regression analysis incorporating these variables, and the only variable that remained statistically significant in the multivariate setting was the Ang-2/Ang-1 ratio, measured at fever onset (Hazard ratio 1.20 - 95%CI 1.02-1.41; $P < 0.01$). Figure 4 illustrates the Kaplan-Meier curve of 30-day survival stratified to less versus greater than the median values of Ang-2/Ang-1 ratio at fever onset. Logrank confirmed statistical significance. The 30-day mortality of patients with Ang-2/Ang-1 ratio below 1.17 was 5.5% compared to 31.6% for patients with greater ratios.

Discussion

Post chemotherapy FN in patients with hematological malignancies is a condition that carries a high risk of sepsis complications with mortality rates as high as 21% [16], usually preceded by septic shock. Patients with FN are a heterogeneous group in terms of risks of complications and mortality, and the identification of parameters capable to accurately identify high risk patients is one of the great challenges in their care. Clinical scores such as the MASCC [21], and laboratory parameters such as C-reactive protein, IL-6, IL-8 and procalcitonin have been recently proved to be useful tools for this purpose [23]. However, it is generally acknowledged that these parameters are more useful to identify patients at low risk for complications, leaving room for refinements in the risk stratification of FN patients. Ideally, one such marker should be easily detected in samples obtained before the

development of severe sepsis, and should not be influenced by cytopenias or by the inflammatory milieu associated with disease status. Elements that are directly involved in the pathogenesis of sepsis complications are thus more attractive candidates than non-specific elements of the inflammatory cascade.

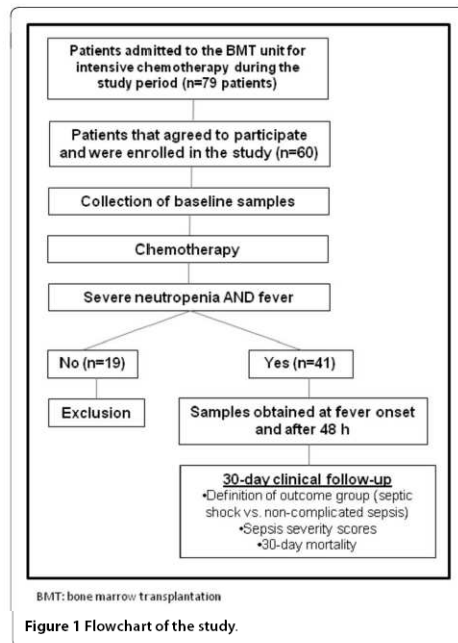
Angiopoietins are a family of vascular growth factors with critical roles in embryonic and postnatal angiogenesis. Ang-1 and Ang-2 both act on the Tie2 tyrosine kinase receptor found primarily on endothelial cells, but appear to play antagonist roles [10]. Apparently, Ang-1 promotes vessel stabilization whereas Ang-2 is involved in the destabilization of newly formed vessels. These processes of disassemble and reassemble of the endothelial lining of primitive blood vessels is important because it allows the incorporation of new endothelial cells to growing endothelial tubes, leading eventually to the formation of functional and mature blood vessels [24]. A role of angiopoietins in the pathogenesis of septic shock is supported by multiple lines of evidence. First, increased levels of Ang-2 levels have been demonstrated in adult and pediatric patients with sepsis in intensive care units (ICU) and these levels correlated with sepsis severity [11,12,14,25]. Second, serum from patients with sepsis has been shown to disrupt endothelial architecture, an effect that correlates with Ang-2 levels, is reversed by Ang-1 and is mimicked by recombinant Ang-2 [14]. Finally, Ang-2 levels have been shown to correlate with pulmonary permeability edema and occurrence of acute respiratory distress syndrome in mechanically ventilated patients [26]. More recently, Kumpers et al, studying a population of 43 medical ICU patients demonstrated that Ang-2 levels at the time of ICU admission was a strong predictor of mortality [12]. Ang-1 levels were also evaluated in some of these studies, but so far studies have failed to a relationship between Ang-1 and sepsis outcomes.

In our prospective study we explored the time-course of Ang-1 and Ang-2 in a population of patients with high

Table 2: Baseline levels of Ang-1 and Ang-2 in the study population

	Healthy individuals (N = 20)	Patients (N = 41)	P*
Ang-1 (pg/ml)	8799.70 (4795.10-14644.00)	3746.90 (76.43-51780.00)	<0.0001
Ang-2 (pg/ml)	41.01 (19.40-246.09)	48.37 (18.81-2892.10)	0.88
	Sepsis € (n = 31)	Septic shock (n = 10)	
Ang-1 (pg/ml)	4156.60 (100.33-51780.00)	3224.00 (76.43-6117.50)	0.30
Ang-2 (pg/ml)	55.22 (19.40-2892.10)	26.04 (18.10-218.60)	0.24

* Mann-Whitney test; € Non-complicated sepsis



risk of sepsis complications before the development of severe sepsis. As far as we are aware, the significance of Ang-1 and Ang-2 levels has not been studied in patients with FN. An additional contribution of our study is that we prospectively evaluated the significance of Ang-1 and Ang-2 levels at an earlier time-point in the development of sepsis (which developed in a median time of 4.1 days after fever onset), as opposed to studies that evaluated patients at the ICU. This difference is evidenced by the median SOFA score of our patients (4 range 1-8) compared to higher median SOFA scores (16 range 1-22) from other key studies [12]. Last, Ang-1 and Ang-2 levels were serially evaluated at three time points, thus offering a view of the time-course of Ang-1 and Ang-2 release in the early hours of sepsis.

For this study we only included patients with hematological malignancies and FN after intensive chemotherapy that were treated as inpatients from day one of chemotherapy until the resolution of neutropenia. By doing so, we intended to obtain a representative sample of patients with high risk of sepsis complications. Furthermore, the fact that all patients were treated as inpatients allowed us to standardize important variables that could affect the validity of our results such as the time between fever onset and sample collection. So as to limit

as much as possible the influence of different diagnosis and chemotherapy regimens on our results, Ang-1 and Ang-2 levels were also collected immediately before the initiation of chemotherapy, allowing differences between outcome groups to be compared not only as absolute values, but also as fold-increase from baseline levels, which did not alter our results (data not shown). In fact, neither Ang-1 nor Ang-2 levels were significantly different before the initiation of chemotherapy between patients with non-complicated sepsis and septic shock, supporting the uniformity of our group of patients as far as the two study variables were concerned.

The main finding of our study is that the relative concentration of Ang-1 and Ang-2 are different in subgroups of patients with FN that evolve to non-complicated sepsis compared to patients that develop septic shock, and that evaluation of these two proteins within the first 48 hours after neutropenic fever, before the development of any signs and symptoms of septic shock, is a promising tool to discriminate high risk patients with FN. In accordance with previous studies, Ang-2 levels were significantly higher in patients with septic shock compared to patients with non-complicated sepsis. This difference was not present at the time of fever onset, rose sharply and became evident after 48 hours, when levels in the poorer outcome group were 8 times higher than in the good outcome group. Importantly, Ang-2 baseline levels were similar. As in previous studies, we were not able to detect any significant difference of Ang-1 levels between study groups. However, when the relative concentrations of these two antagonistic cytokines were evaluated, we did observe a relative deficiency of Ang-1 compared to Ang-2 levels in patients that developed septic shock, that was evident early at the time of fever onset. It has been known for more than a decade that Ang-1 can protect adult vasculature against VEGF-induced plasma leakage [10]. Ang-1 has also been shown to protect mice from endotoxic shock [27]. In this respect, it is tempting to speculate that the imbalance between Ang-1 and Ang-2 levels present already at the time of fever onset is associated with a poorer outcome of sepsis in FN, and possibly in other patients with sepsis. This hypothesis is well illustrated in our work by the divergent trend of Ang-2/Ang-1 ratio observed in each outcome subgroup of patients. Early in the course of sepsis, patients that evolved to septic shock presented a 7-fold increase in the Ang-2/Ang-1 ratio, whereas patients with non-complicated sepsis presented a 0.8 decrease when compared to baseline (pre-chemotherapy) ratios. After 48 hours, this divergent trend persisted, with patients that evolved to septic shock presenting a 10-fold increase, and patients with non-complicated sepsis with a 0.4-fold decrease. We also evaluated VWF antigen levels, which is increased in patients with sepsis [28], and is an indicator of endothelial dys-

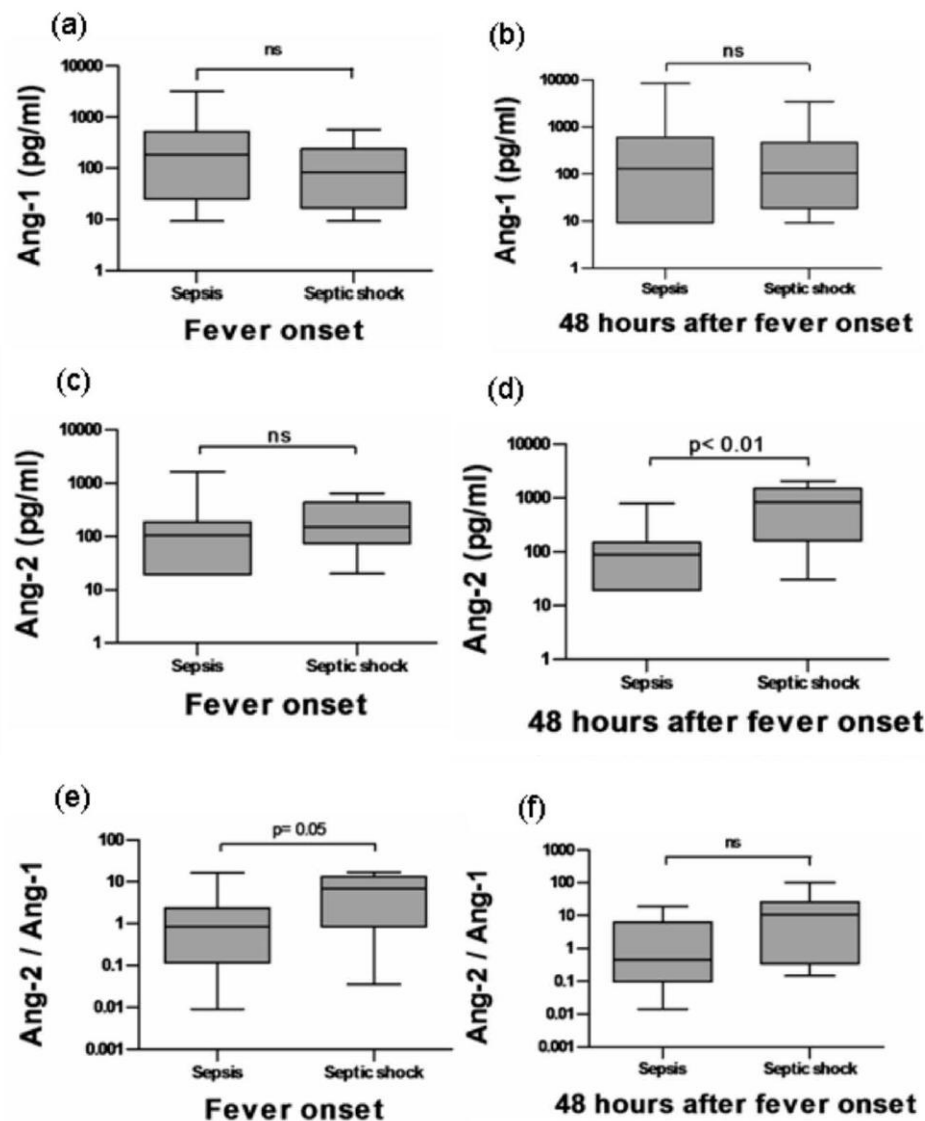


Figure 2 Serum angiopoietin levels in patients with febrile neutropenia stratified by outcome group. Box plots representing serial concentrations of angiopoietins in patients with febrile neutropenia that presented non-complicated sepsis (n = 31) or septic shock (n = 10). Ang-1 at the time of fever onset (a) and after 48 hours (b). Ang-2 at the time of fever onset (c) and after 48 hours (d). Ang-2/Ang-1 ratio at the time of fever onset (e) and after 48 hours (f). Horizontal bars indicate median values. Mann-Whitney test.

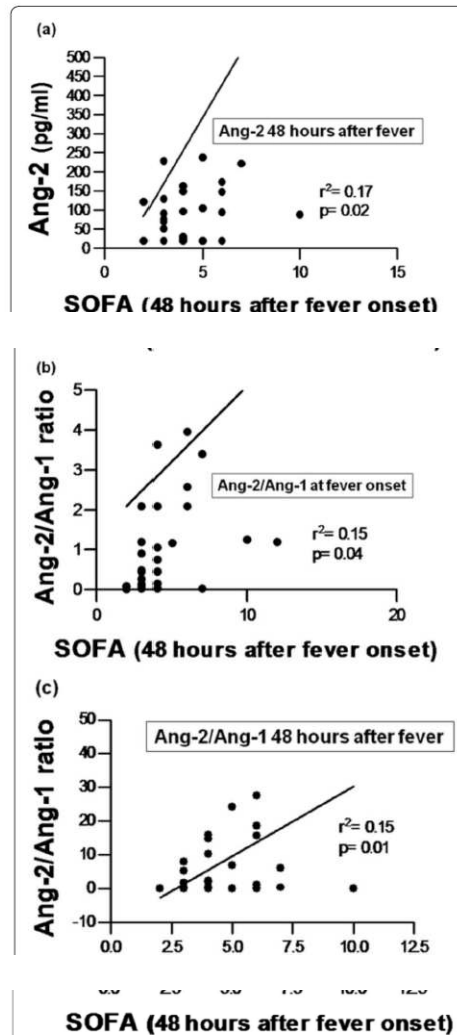


Figure 3 Correlation of angiopoietin levels with the SOFA sepsis severity score. Scatter plots showing linear regression analysis between Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) scores and (a) Ang-2 concentrations measured 48 h after fever onset, (b) Ang-2/Ang-1 ratio measured at fever onset (b) and 48 hours thereafter (c).

function and stimulation [29]. In contrast to Ang-2, no difference could be observed between both patient groups at any time-point (table 1). We also demonstrated a significant, though weak correlation of Ang-2 concentrations 48 hours after fever onset and of Ang-2/Ang-1 ratio (both at fever onset and after 48 hours) with the

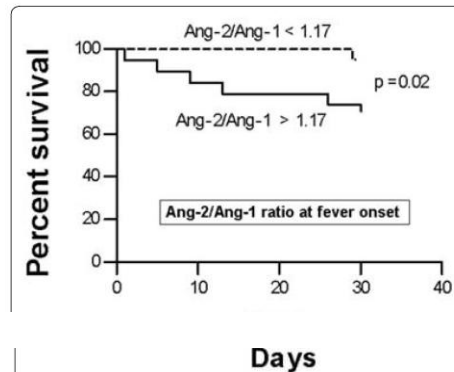


Figure 4 Survival of patients with febrile neutropenia according to Ang-2/Ang-1 ratio at the time of fever onset. Kaplan-Meier curve (less versus greater than median; * Logrank test).

SOFA score of sepsis severity. Based on these results, we estimated diagnostic accuracy of Ang-2 concentrations 48 hours after fever and of Ang-2/Ang-1 ratio at fever onset. Despite wide confidence intervals, area under the ROC curves suggest that both biomarkers should be further investigated as promising tools to discriminate high-risk FN patients in studies with larger sample sizes. The relationship between angiopoietin concentrations and 30-day mortality was also evaluated. Using a multivariate Cox model, we demonstrate that the Ang-2/Ang-1 ratio at the time of fever onset can be an independent predictor of sepsis survival in our population, an observation that will have to be validated in larger studies.

Recently, the time course of Ang-1 and Ang-2 release was evaluated in a model of human endotoxemia [13], which showed that Ang-2 release is initiated 2.5 hours after LPS challenge, and observed no significant variations in levels of Ang-1. Ang-2 is a Weibel-Palade body-stored molecule that is rapidly released upon endothelial stimulation. In contrast, Ang-1 is believed to exert its ves-

sel-sealing effect by low-level constitutive activation of the Tie2 receptor, in a model in which constitutive Ang-1/Tie2 interactions control endothelial barrier integrity as a default pathway, and Ang-2 acts as a dynamically regulated antagonizing cytokine [30]. Our results showing that patients that evolve to septic shock present an initial relative deficiency of Ang-1 associated with a sharp increase in Ang-2 levels in the first 48 hours of sepsis supports that similar events can be involved in the pathogenesis of septic shock in FN.

There are certain limitations of our study that need to be acknowledged to avoid overinterpretation of its conclusions. Research about new diagnostic tools follow a sequence of phases along which the questions answered by each phase progress from the demonstration that a

biomarker behaves differently in diseased and normal individuals (phase I) to the ultimate demonstration of improved clinical outcomes after its incorporation (phase IV) [31]. Ours is a phase II study in which the performance of a new diagnostic assay was tested in patients with a defined condition (febrile neutropenia) and potential different outcomes, but in which several confounding variables were controlled. Phase II studies tell us whether the test shows diagnostic promise under ideal conditions. Therefore, our study design does not allow us to universalize our conclusions to clinical settings where the impact of treatment related and other variables might reject our conclusions. For the formal validation of the assay and its incorporation into clinical practice, a larger sample size (ideally from distinct centers) under less controlled conditions should be used. The relatively low number of deaths used for the multivariate analysis also deserves to be discussed. Our study design required a very specific population of patients, with stringent inclusion criteria to control confounding variables, so that a further increase in sample size was not feasible. On the other hand, it has been demonstrated that relaxing the rule of 10 events per variable in Cox models is possible without unacceptable increases in confounding bias [32]. With this in mind, we believe that as long as the above-mentioned limits of our study are acknowledged, the association of 30-day mortality with Ang-2/Ang-1 ratio is an important information to the literature.

Conclusions

In summary, our data suggest that imbalances in the concentrations of Ang-1 and Ang-2 present already at the time of the first fever peak is an independent marker of the risk of developing septic shock and of 30-day mortality in FN. Further studies are warranted to validate this new biomarker as clinically relevant tool in the daily care of these patients. In addition, therapeutic strategies designed to manipulate the Ang-2/Ang-1 imbalance can offer a new and promising paradigm for the treatment of sepsis and septic shock in patients with FN.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

BEA enrolled patients, recorded clinical data, performed laboratory analysis and contributed to manuscript production; SALM and TMGS performed laboratory analysis; FJPA performed statistical analysis and reviewed the manuscript; CAS, IL and JMA contributed to the study design and reviewed the manuscript; EVDP designed the study, analyzed data and contributed to manuscript production. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was financially supported by Fapesp and CNPq, Brazil. The Hematology and Hemotherapy Center - Hemocentro UNICAMP, forms part of the National Institute of Science and Technology of Blood, Brazil (INCT do Sangue CNPq/MCT/FAPESP).

Author Details

¹Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil and ²Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Received: 29 January 2010 Accepted: 28 May 2010
Published: 28 May 2010

References

- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ: 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, 101(6):1644-1655.
- 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(16):1546-1554.
- De Backer D, Donadello K, Favory R: Link between coagulation abnormalities and microcirculatory dysfunction in critically ill patients. *Curr Opin Anaesthesiol* 2009, 22(2):150-154.
- Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003, 348(2):138-150.
- Warren HS, Suffredini AF, Eichacker PQ, Munford RS: Risks and benefits of activated protein C treatment for severe sepsis. *N Engl J Med* 2002, 347(13):1027-1030.
- Spronk PE, Zandstra DF, Ince C: Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. *Crit Care* 2004, 8(6):462-468.
- Yano K, Liaw PC, Mullington JM, Shih SC, Okada H, Bodvak N, Kanq PM, Tolit L, Bellkoff B, Buras J, et al: Vascular endothelial growth factor is an important determinant of sepsis morbidity and mortality. *J Exp Med* 2006, 203(6):1447-1458.
- Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koldil S, Thurston G, Gale NW, Witzernath M, Rosseau S, Sutorp N, et al: Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* 2006, 12(2):235-239.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, et al: Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997, 277(5322):55-60.
- Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM, Yancopoulos GD: Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 2000, 6(4):460-463.
- Giuliano JS Jr, Lahni PM, Harmon K, Wong HR, Doughty LA, Carcillo JA, Zingarelli B, Sukhatme VP, Parikh SM, Wheeler DS: Admission angiopoietin levels in children with septic shock. *Shock* 2007, 28(6):650-654.
- Kumpers P, Lukasz A, David S, Horn R, Hafer C, Faulhaber-Walter R, Fliser D, Haller H, Kielstein JT: Excess circulating angiopoietin-2 is a strong predictor of mortality in critically ill medical patients. *Crit Care* 2008, 12(6):R147.
- Kumpers P, van Meurs M, David S, Molema G, Bijzet J, Lukasz A, Bliert F, Haller H, Zijlstra JG: Time course of angiopoietin-2 release during experimental human endotoxemia and sepsis. *Crit Care* 2009, 13(3):R64.
- Parikh SM, Mammoto T, Schultz A, Yuan HT, Christiani D, Karumanchi SA, Sukhatme VP: Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans. *PLoS Med* 2006, 3(3):e46.
- Siner JM, Bhandari V, Engle KM, Elias JA, Siegel MD: Elevated serum angiopoietin 2 levels are associated with increased mortality in sepsis. *Shock* 2009, 31(4):348-353.
- Herbst C, Naumann F, Kruse EB, Monsef I, Bohlius J, Schulz H, Engert A: Prophylactic antibiotics or G-CSF for the prevention of infections and improvement of survival in cancer patients undergoing chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev* 2009:CD007107.
- Cherif H, Johansson E, Bjorkholm M, Kalin M: The feasibility of early hospital discharge with oral antimicrobial therapy in low risk patients with febrile neutropenia following chemotherapy for hematologic malignancies. *Haematologica* 2006, 91(2):215-222.
- Malik I, Hussain M, Yousuf H: Clinical characteristics and therapeutic outcome of patients with febrile neutropenia who present in shock: need for better strategies. *J Infect* 2001, 42(2):120-125.

19. Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, Bow EJ, Brown AE, Calandra T, Feld R, Pizzo PA, Rolston KV, Shenep JL, et al.: 2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis* 2002, **34**(6):730-751.
20. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG: 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**(7):707-710.
21. Klastersky J, Paesmans M, Rubenstein EB, Boyer M, Elting L, Feld R, Gallagher J, Herrstedt J, Rapoport B, Rolston K, et al.: The Multinational Association for Supportive Care in Cancer risk index: A multinational scoring system for identifying low-risk febrile neutropenic cancer patients. *J Clin Oncol* 2000, **18**(16):3038-3051.
22. Uys A, Rapoport BL, Anderson R: Febrile neutropenia: a prospective study to validate the Multinational Association of Supportive Care of Cancer (MASCC) risk-index score. *Support Care Cancer* 2004, **12**(8):555-560.
23. Ellis M: Febrile neutropenia. *Ann NY Acad Sci* 2008, **1138**:329-350.
24. Conway EM, Collen D, Carmeliet P: Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001, **49**(3):507-521.
25. Orfanos SE, Kotanidou A, Glynos C, Athanasiou C, Tsigkos S, Dimopoulou I, Sotiropoulou C, Zakythinou S, Armaganidis A, Papapetropoulos A, et al.: Angiotensin-2 is increased in severe sepsis: correlation with inflammatory mediators. *Crit Care Med* 2007, **35**(1):199-206.
26. Heijden M van der, van Nieuw Amerongen GP, Koolwijk P, van Hinsbergh VW, Groeneveld AB: Angiotensin-2, permeability oedema, occurrence and severity of ALI/ARDS in septic and non-septic critically ill patients. *Thorax* 2008, **63**(10):903-909.
27. Wittenbichler B, Westermann D, Kneuppel S, Schultheiss HP, Tschope C: Protective role of angiotensin-1 in endotoxic shock. *Circulation* 2005, **111**(1):97-105.
28. Kremer Hovinga JA, Zeerleder S, Kessler P, Romani de Wit T, van Mourik JA, Hack CE, ten Cate H, Reitsma PH, Willemin WA, Lammle B: ADAMTS-13, von Willebrand factor and related parameters in severe sepsis and septic shock. *J Thromb Haemost* 2007, **5**(11):2284-2290.
29. Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, Meisner M: Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit Care Med* 2002, **30**(5 Suppl):S302-312.
30. Fiedler U, Scharpfenecker M, Kold S, Hegen A, Grunow V, Schmidt JM, Kriz W, Thurston G, Augustin HG: The Tie-2 ligand angiotensin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood* 2004, **103**(11):4150-4156.
31. Sackett DL, Haynes RB: The architecture of diagnostic research. *BMJ* 2002, **324**(7336):539-541.
32. Vittinghoff E, McCulloch CE: Relaxing the rule of ten events per variable in logistic and Cox regression. *Am J Epidemiol* 2007, **165**(6):710-718.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/10/143/prepub>

doi:10.1186/1471-2334-10-143

Cite this article as: Alves et al.: Imbalances in serum angiotensin concentrations are early predictors of septic shock development in patients with post chemotherapy febrile neutropenia *BMC Infectious Diseases* 2010, **10**:143

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





RESEARCH

Open Access

Time-course of sFlt-1 and VEGF-A release in neutropenic patients with sepsis and septic shock: a prospective study

Brunna E Alves¹, Silmara AL Montalvão¹, Francisco JP Aranha¹, Irene Lorand-Metze², Carmino A De Souza², Joyce M Annichino-Bizzacchi², Erich V De Paula^{1*}

Abstract

Background: Septic shock is the most feared complication of chemotherapy-induced febrile neutropenia. So far, there are no robust biomarkers that can stratify patients to the risk of sepsis complications. The VEGF-A axis is involved in the control of microvascular permeability and has been involved in the pathogenesis of conditions associated with endothelial barrier disruption such as sepsis. sFlt-1 is a soluble variant of the VEGF-A receptor VEGFR-1 that acts as a decoy receptor down-regulating the effects of VEGF-A. In animal models of sepsis, sFlt-1 was capable to block the barrier-breaking negative effects of VEGF-A and to significantly decrease mortality. In non-neutropenic patients, sFlt-1 has been shown to be a promising biomarker for sepsis severity.

Methods: We prospectively evaluated concentrations of sFlt-1 and VEGF-A at different time-points during febrile neutropenia, and evaluated the association of these levels with sepsis severity and septic shock development.

Results: Neutropenic patients that evolved with septic shock ($n = 10$) presented higher levels of sFlt-1 and VEGF-A measured 48 hours after fever onset than patients with non-complicated sepsis ($n = 31$) and levels of these biomarkers correlated with sepsis severity scores. Estimation of the diagnostic accuracy of sFlt-1 levels for the discrimination of patients that evolved to septic shock yielded promising results in our study population.

Discussion: Our data suggest that sFlt-1 and VEGF-A could be useful biomarkers for sepsis severity in patients with febrile neutropenia. In addition, the kinetics of sFlt-1 release in patients that evolve to septic shock suggest that the sFlt-1 could be a salvage compensatory mechanism in patients with septic shock, but that the magnitude of the sFlt-1 release observed in human sepsis is not sufficient to reproduce the beneficial anti-VEGF-A effects observed in animal models of sepsis.

Background

Patients with hematological malignancies submitted to intensive chemotherapy present a higher risk of sepsis and sepsis complications. Febrile neutropenia (FN) in these patients is considered a medical emergency, and a standardized management approach including wide-spectrum antibiotics and admission is usually implemented for all patients. So far, there are no reliable laboratory markers to indicate whether FN patients will recover uneventfully or rapidly deteriorate to sepsis, septic shock and death [1,2].

Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) is an endothelial growth factor that is widely known for its key role in the regulation of embryonic and post-natal angiogenesis. However, VEGF-A was first characterized by its endothelial barrier-breaking properties, as a potent stimulator of endothelial permeability [3]. This capability to disrupt the integrity of an endothelial cell tube is in fact very important during angiogenesis, as new cells have to be incorporated in a growing vessel. Recently, this property has been explored as a putative common downstream mechanism in pathological conditions associated with loss of endothelial barrier function. In line with this hypothesis, several authors have demonstrated elevated VEGF-A levels in intensive care units (ICU)

* Correspondence: erich@unicamp.br

¹Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2011 Alves et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

patients with sepsis, as well as associations between VEGF-A levels and sepsis severity [4-6].

sFlt-1 is a natural splice variant of the tyrosine-kinase receptor Flt-1, which is an endothelial cell receptor for VEGF-A. sFlt-1 binds free VEGF-A and acts as its antagonist [7]. In animal models of sepsis, sFlt-1 has been shown to attenuate the severity of the inflammatory response and to antagonize the barrier-breaking properties of VEGF-A, thus suggesting a therapeutic role for this protein [8]. The potential value of sFlt-1 as a biomarker for sepsis severity has been demonstrated in studies with non-neutropenic patients [6,9].

Here we prospectively evaluated the serial expression of sFlt-1 and VEGF-A in patients with hematological malignancies and chemotherapy-related FN, to gain insights about both potential roles of sFlt-1 in patients with febrile neutropenia and sepsis, as a biomarker or as a therapeutic tool.

Methods

Patient's eligibility criteria

Recruitment took place at the Bone Marrow Transplantation Unit of our University hospital between March 2008 and March 2009. Inclusion criteria were: (1) diagnosis of hematological malignancies, and (2) admission as inpatients for intensive chemotherapy (induction for acute leukemia or high-dose sequential therapy for lymphomas) or hematopoietic stem-cell transplantation (HSCT). Patients were invited to participate before the initiation of chemotherapy. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the local ethics committee and informed written consent was obtained from all patients. Fever ($T \geq 38.0^{\circ}\text{C}$) at admission for chemotherapy was the only exclusion criteria, but only patients that presented fever during neutropenia (defined as a neutrophil count $< 500/\mu\text{l}$) were included in the second phase (see laboratory measurements). Clinical data were obtained from the medical records.

Sepsis definitions and risk stratification scores

Sepsis, in this population, was defined by the presence of two or more of the following: (1) temperature $> 38.0^{\circ}\text{C}$, (2) heart rate > 90 beats/min, (3) respiratory rate > 20 breaths/min or $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg; and a microbiologically proven or clinically evident source of infection [10]. In accordance with current management protocols, an infectious etiology was assumed for all FN patients, and broad-spectrum antibiotics were initiated immediately after cultures were obtained [11]. Septic shock was present in patients in which sepsis was complicated with hypoperfusion or hypotension (systolic arterial pressure < 90 mmHg or a reduction in systolic blood pressure of > 40 mmHg from baseline), despite adequate volume resuscitation. Severity

of illness was assessed by calculating the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score [12] daily after the development of fever. Patients were also stratified by the Multinational Association for Supportive Care in Cancer (MASCC) score at the time of fever [13,14].

Laboratory measurements

Venous blood was drawn within 12 hours after first episode of neutropenic fever, and 48 hours thereafter. Serum levels of VEGF-A and sFlt-1 were measured in duplicate using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions.

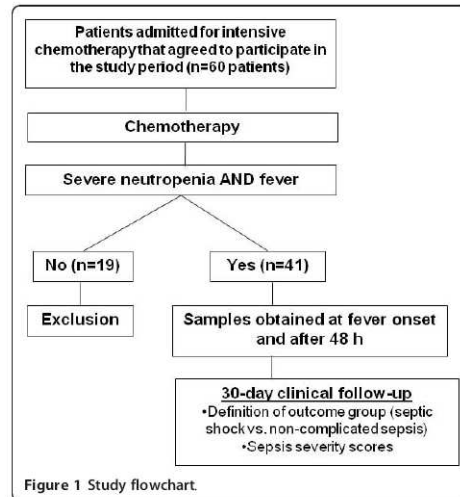
Statistical Analysis

Patients were divided in two outcome subgroups according to the presence or absence of septic shock at any time point before the resolution of neutropenia and before 30 days. Differences in continuous and categorical variables were analyzed using the Mann-Whitney or Fisher's exact test respectively. Data are expressed as median and range unless otherwise stated. Correlation analysis (Spearman's rank correlation) was performed between sepsis severity scores and VEGF-A and sFlt-1 concentrations. Receiver operator characteristics (ROC) procedures were used to estimate diagnostic accuracy. A P value less than or equal to 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed with the GraphPad Prism Software (GraphPad Prism Software Inc. San Diego, California, USA).

Results

Patients Characteristics

Of 60 patients that were included in the study, only 41 experienced neutropenic fever and completed the study (Figure 1). Patient characteristics are shown in Table 1. Septic shock during the period of neutropenia requiring mechanical ventilation was present in 10 patients, but was not present at study entry in any of the patients. Median time to septic shock development was 4.1 days (range 1 - 7 days) after the first episode of neutropenic fever, and in only one patient, septic shock onset occurred in the first 48 hours after study entry. The median time between the onset of septic shock and the need for mechanical ventilation was 1 day (range 0-2 days). Eight patients died from complications of sepsis within the first 30 days after the onset of fever, yielding an overall 30-day mortality of 13.3%. Clinical significant differences between patients with non-complicated sepsis and septic shock included age, presence of bloodstream infection, SOFA score 48 hours after fever onset and MASCC score at FN onset. Gram-negative and Gram-positive organisms were isolated in 7 and 6 patients respectively, whereas fungi were



isolated in 3 patients. Isolated microorganisms included: *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. viridans*, *Fusarium* and *Aspergillus*. Four patients had blood cultures positives for two pathogens.

Time-course of sFlt-1 and VEGF-A expression in FN

At the time of fever onset no statistical significant difference could be detected between VEGF-A levels in patients with non-complicated sepsis (20.7 pg/ml, range 7.9-129.3 pg/ml) or with septic shock (20.0 pg/ml, range 9.3-158.9 pg/ml; $P = 0.9$). However, after 48 hours, VEGF-A levels were higher in patients with septic shock (33.0 pg/ml, range 13.0-241.9 pg/ml) compared to patients with non-complicated sepsis (20.9 pg/ml, range 5.6-124.4 pg/ml; $P = 0.03$) (Figure 1). Similar to VEGF-A, no difference could be observed between sFlt-1 levels at the time of neutropenic fever between patients with non-complicated sepsis (47.3 pg/ml, range 20.8-117.6 pg/ml) and septic shock (49.2 pg/ml, range 29.6-91.1 pg/ml; $P = 0.3$). However, 48 hours after neutropenic fever a marked difference could be observed between patients with and without septic shock, with increased sFlt-1 concentrations in patients with septic shock (116.0 pg/ml, range 42.7-208.4 pg/ml) compared to patients with non-complicated sepsis (42.9 pg/ml, range 25.9-472.9 pg/ml; $P = 0.002$) (Figure 2).

Association of serum sFlt-1 and VEGF-A levels with sepsis prognosis

To explore a potential association of sFlt-1 and VEGF-A levels with sepsis outcome in patients with FN, we first evaluated whether serum VEGF-A and sFlt-1 levels correlated with sepsis severity scores. As shown in Table 2, sFlt-1 measured at fever onset was significantly

Table 1 Patient characteristics

	Sepsis $\forall$ (n = 31)	Septic shock (n = 10)	P
Gender			0.16 **
Male	13 (42%)	7 (70%)	
Female	18 (58%)	3 (30%)	
Age (median, range)	37 (16-55)	55 (24-62)	$P < 0.01$ *
Disease status			0.12 **
Complete remission	13 (42%)	1 (10%)	
Active disease	18 (58%)	9 (90%)	
Treatment			0.48 **
Intensive CTx (includes autologous HSCT)	17 (55%)	6 (60%)	
Allogeneic HSCT	14 (45%)	4 (40%)	
Neutrophils/ μ l - Fever (median, range)	60 (0 - 290)	50 (20 - 470)	0.40 *
Days of neutropenia (median, range)	12 (4 - 22)	14 (7 - 30)	0.36 *
Platelets $\times 10^3/\mu$ l - fever (median, range)	25 (6 - 169)	38 (12 - 90)	0.16 *
Days with fever (median, range)	4 (1 - 12)	5 (1 - 12)	0.65 *
SOFA score - fever onset (median, range)	3 (0 - 7)	4 (2 - 8)	0.31 *
SOFA score - 48 hours (median, range)	4 (2 - 7)	7 (4 - 16)	$P = 0.01$ *
MASCC score (median, range)	21 (16 - 23)	18 (11 - 24)	$P = 0.03$ *
Agent isolation in bloodstream			$P < 0.001$ **
Yes	4 (13%)	8 (80%)	
No	27 (87%)	2 (20%)	

$\forall$ Non-complicated sepsis; * Mann-Whitney test; ** Fisher's exact test. HSCT: Hematopoietic stem cell transplantation; CTx: chemotherapy.

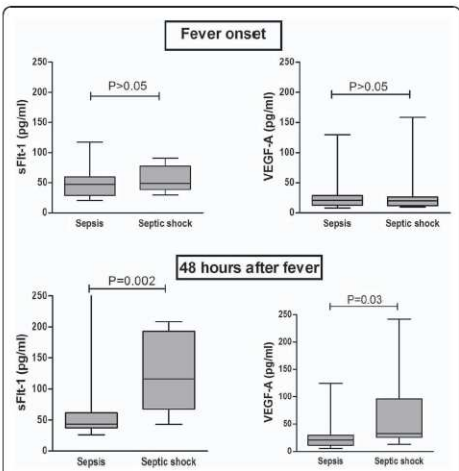


Figure 2 Serum sFlt-1 and VEGF-A levels in FN. Box plots representing serial concentrations of sFlt-1 and VEGF-A in patients with FN with non-complicated sepsis (n = 31) or septic shock (n = 10) at fever onset and 48 hours thereafter. Mann-Whitney test.

correlated with both MASCC and SOFA scores. VEGF-A level (measured at fever onset) correlated with SOFA score calculated 48 hours after fever onset (Table 2). Next, we explored whether the individual or combined analysis of sFlt-1 and VEGF-A levels could help in risk stratification of patients with FN. In order to do so, we plotted simultaneously the values of sFlt-1 and VEGF-A in patients with non-complicated sepsis and septic shock, dichotomizing marker levels by their median values. The graphic representation of this analysis seems

Table 2 Correlation of sFlt-1 and VEGF-A with severity of illness

	MASCC	SOFA (Fever onset)	SOFA (48 hours)
VEGF-A (fever onset)	$R_s = -0.18$ $P = 0.31$	$R_s = -0.21$ $P = 0.23$	$R_s = -0.17$ $P = 0.33$
VEGF-A (48 hours)	$R_s = -0.43$ $P = 0.03$	-	$R_s = 0.09$ $P = 0.66$
sFlt-1 (Fever onset)	$R_s = -0.42$ $P < 0.01$	$R_s = 0.33$ $P = 0.04$	$R_s = 0.32$ $P = 0.04$
sFlt-1 (48 hours)	$R_s = -0.11$ $P = 0.52$	-	$R_s = 0.25$ $P = 0.16$

The Spearman's correlation coefficients (R_s) for sFlt-1 and VEGF-A measured at fever onset and after 48 hours with the severity of illness scores are shown. The correlation of the markers after 48 hours of fever onset with scores at the time of fever onset was not assessed.

to indicate that 48 hours after fever onset, patients that evolve to septic shock are more likely to present above median levels of both sFlt-1 and VEGF-A, than patients with non-complicated sepsis (Figure 3). Furthermore, the relative risk for septic shock development in patients with both levels above the median compared to all other patients was 6.9 (1.67-28.5; $P = 0.004$; Fisher's exact test).

Finally, we estimated the diagnostic accuracy of sFlt-1 and VEGF-A levels using ROC procedures in our study population. When measured at fever onset, neither sFlt-1 nor VEGF-A levels yielded area under the ROC curve values that indicated any diagnostic capacity to discriminate patients that would evolve to non-complicated sepsis or to septic shock patients. However, when measured 48 hours after fever onset, when clinical signs of septic shock were still not present in any but one patient, both markers yielded area under the ROC curve values that suggest a diagnostic capacity for the discrimination of FN that evolve to septic shock (Table 3).

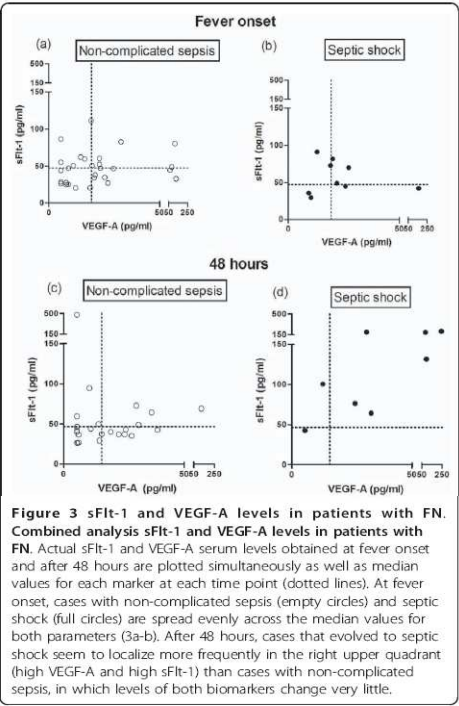


Figure 3 sFlt-1 and VEGF-A levels in patients with FN. Combined analysis sFlt-1 and VEGF-A levels in patients with FN. Actual sFlt-1 and VEGF-A serum levels obtained at fever onset and after 48 hours are plotted simultaneously as well as median values for each marker at each time point (dotted lines). At fever onset, cases with non-complicated sepsis (empty circles) and septic shock (full circles) are spread evenly across the median values for both parameters (3a-b). After 48 hours, cases that evolved to septic shock seem to localize more frequently in the right upper quadrant (high VEGF-A and high sFlt-1) than cases with non-complicated sepsis, in which levels of both biomarkers change very little.

Table 3 Diagnostic accuracy of sFlt-1 and VEGF-A levels for septic shock development

Biomarker Time-point	sFlt-1	VEGF-A
Fever onset		
AUC *	0.61 (0.41-0.81); P = 0.81	0.58 (0.38-0.77); P = 0.47
48 hours after fever onset		
AUC *	0.87 (0.73-1.00); P < 0.01	0.76 (0.55-0.97); P = 0.02

*AUC: area under ROC curve; sFlt-1 and VEGF-A thresholds correspond to the median value for each time point. AUC expressed with 95% confidence interval (CI95%).

Discussion

Despite improvements in supportive care, complications of sepsis are still one of the main challenges in the management of patients submitted to intensive chemotherapy. Patients with FN are particularly prone to sepsis complications, and because no clinical or laboratory marker can reliably identify patients at lower risk of septic shock, immediate admission and broad-spectrum antibiotics is still the most widely strategy used in the management of patients with FN. Although the use of oral antibiotics in low risk patients has been shown to be safe [15], a robust definition of a low risk patient is still not available [16]. The MASCC score, which is the most studied model, seems to yield, in limited studies, a 71% sensitivity and a 91% positive predictive value to identify low-risk patients [17]. However, subjectivity in clinical assessment of the "disease burden" parameter, the rarity of chronic obstructive lung disease in children and young adults, and its limited validation in the outpatient setting and in patients with acute leukemia still preclude its widespread adoption for the management of FN patients. This opens room for the search of biomarkers that could reliably stratify patients with higher risk of sepsis complications. In addition, preliminary data from animal studies suggest that sFlt-1 could play an important role in the treatment of sepsis, as an endothelial barrier stabilizing agent, provided that the VEGF-A and sFlt-1 axis indeed play clinical relevant roles in the pathogenesis of sepsis complications in humans. Therefore we explored the time-course and the significance of serum levels of sFlt-1 and VEGF-A in patients with FN and hematological malignancies.

The endothelial barrier-breaking properties of VEGF-A are less widely characterized than its mitogenic effects on endothelial cells. Rather than an independent function, this barrier-breaking property is indeed an important part of VEGF-A's role in the regulation of angiogenesis, as the disassemble of an intact endothelial line is necessary for the incorporation of new endothelial cells during vessel sprout. The clinical relevance of

this effect in humans was observed more than a decade ago, when patients treated with low dose VEGF-A to boost revascularization in critical limb ischemia presented peripheral edema as a consistent adverse event [18]. Following this observation, elevated VEGF-A levels have been associated with a variety of conditions that share the disruption of the endothelial barrier as a common pathogenic mechanism, including sepsis [19,20]. In intensive care unit patients with sepsis, levels of VEGF-A have also been associated with disease severity and mortality [4-6,21]. More recently, VEGF-A levels were evaluated in a smaller study with patients with FN, which observed higher VEGF-A levels in patients that evolved to severe sepsis compared to patients with non-complicated sepsis [22]. VEGF-A acts by binding to two tyrosine-kinase transmembrane receptors: VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2, mainly expressed in endothelial cells. VEGF-A and its receptors act in conjunction with other regulators of angiogenesis such as the angio-poiein/Tie-2 axis, which has also been associated with sepsis diagnosis and outcome by we and others [23-26]. sFlt-1 is a splice variant of the receptor VEGFR-1. sFlt-1 is secreted in soluble form, binds VEGF-A and acts as a decoy receptor, down-regulating its cellular effects. sFlt-1 has been shown to protect mice from VEGF-A induced sepsis [27]. Antagonism of VEGF-A by sFlt-1 has also been explored therapeutically in the treatment of pathogenic vessel growth in cancer and other diseases [28,29]. In our study we demonstrated that patients with FN that evolve to septic shock present higher serum levels of VEGF-A compared to patients with non-complicated sepsis, when measured 48 hours after fever onset. Our observation confirms, in a larger population of patients with septic shock (10 patients), a recent study in patients with FN in which only 1 patient evolved to septic shock [22]. We also describe for the first time that sFlt-1 levels are higher in severely neutropenic patients that evolve to septic shock compared to patients with non-complicated sepsis, and that this increase is only present 48 hours after fever onset. This observation is consistent with recent studies from one group that evaluated sFlt-1 levels in non-neutropenic patients with sepsis and septic shock [6,9] that also observed higher sFlt-1 levels in patients with septic shock, and that sFlt-1 could be a useful biomarker for sepsis severity. Furthermore, we demonstrated that both VEGF-A and sFlt-1 levels correlated with sepsis severity scores.

An interesting finding of our study is the divergent trend of sFlt-1 levels observed in patients that evolve to septic shock (towards higher levels) compared to patients that recover uneventfully (unchanged levels) (Figure 2). This trend seems to indicate that higher sFlt-1 serum levels in the former group of patients could be

the expression of an additional compensatory mechanism, triggered by the failure of sFlt-1-independent mechanisms that maintain endothelial barrier in patients of the latter group. In animal models of sepsis, over-expression of sFlt-1 was capable to completely block the barrier-breaking effects of VEGF-A and to reduce mortality, suggesting that sFlt-1 could be used as a regulator of vascular permeability in pathological conditions. However, this was possible by using a gene transfer strategy that resulted in a more than 100-fold increase in sFlt-1 levels [8]. Our data demonstrate that the up to 10-fold elevation of sFlt-1 serum concentration observed in humans was not sufficient to block the development of septic shock in patients with FN. Whether several-fold higher elevations of sFlt-1 could effectively block the endothelial barrier disruption present in patients with septic shock is an exciting scientific question that remains to be answered.

In our study, initial samples were collected very early after fever onset, when no signs of sepsis complications were present. Median time to septic shock development in our study was 4 days, and even samples collected 48 hours after fever were still obtained before the development of overt septic shock, in all but one patient. This was only possible because of the in-hospital design of our study in which patients were under strict monitoring for fever signs, and contrasts with studies of sFlt-1 and VEGF-A levels in non-neutropenic patients, which were mostly performed in intensive care units, after the development of sepsis complications. Even though this specific characteristic of our study does not reproduce real-life practice where a biomarker would be used, it probably allows a more comprehensive evaluation of the kinetics of sFlt-1 and VEGF-A release in human sepsis. In our study, differences in sFlt-1 and VEGF-A levels could not be demonstrated at fever onset, and were only present 48 hours thereafter. This is also in contrast with the observation of higher sFlt-1 and VEGF-A levels in non-neutropenic patients with sepsis at "early" time points. Again, we believe that rather than a difference in the kinetics of sFlt-1 and VEGF-A release in patients with neutropenia, this difference reflects the earlier evaluation of these biomarker levels in our patients compared to previous studies. Indeed, the fact that none of the observed differences in biomarker levels were present at fever onset has important implications. First, it suggests that VEGF-A and sFlt-1 increases are a relatively later consequence of the cascade of events that leads to septic shock. This hypothesis is supported by the intuitive assumption that VEGF-A acts as one of the final downstream elements in the pathogenesis of septic shock, and is consistent with our previous hypothesis that sFlt-1 is released as a salvage compensatory mechanism to restore barrier function. A second clinical

implication of our results refers to the use of sFlt-1 and VEGF-A for risk stratification of patients with FN. In our study, the estimation of diagnostic accuracy of VEGF-A and sFlt-1 yielded promising results only when levels were measured 48 hours after fever onset. An ideal biomarker for risk stratification in FN should not require serial sampling, as this would not allow early discharge of low risk patients. Future studies with higher number of patients and under a less controlled environment (including outpatients) are warranted to check whether levels of these biomarkers obtained in a "real world" setting will be able to capture this increase in sFlt-1 and/or VEGF-A levels of patients with a worse prognosis and accurately discriminate FN patients with different outcomes.

The major sources of VEGF-A in sepsis are still a matter of debate, and no information on the source of sFlt-1 in sepsis had been published so far. A study with healthy volunteers suggested that platelets, and mainly granulocytes are the sources of more than 90% of circulating VEGF-A [30]. In contrast, in an animal model of sepsis VEGF-A levels increased in liver, kidney and heart, and no difference could be detected between VEGF-A levels in serum and plasma, arguing against a major role of platelets as a source of VEGF-A [8]. In our study, VEGF-A and sFlt-1 serum levels were approximately 5 and 10-fold lower respectively than plasma levels in non-neutropenic septic patients, thus suggesting that platelets and granulocytes do represent an important source of these cytokines in sepsis [6]. However, no difference in neutrophil and platelet counts could be demonstrated between patients with non-complicated sepsis and septic shock at fever onset (Table 1), and no statistical significant correlation could be demonstrated between VEGF-A and sFlt-1 levels with platelet and neutrophil counts at any time-point (data not shown).

Our study has several limitations including a relatively low number of patients, which precludes subgroup analysis, a single-center design and the fact that the in-hospital setting does not reproduce the real-life conditions where a biomarker would be useful. However, our exploratory study was not aimed to definitively prove or rule out the usefulness of sFlt-1 and VEGF-A determinations as biomarkers of sepsis severity in FN, but rather to test whether these biomarkers showed diagnostic promise under controlled and ideal conditions. In other words, the limitations of our study could also be regarded as its strengths, if it is acknowledged that it was designed to answer a "phase 2 question" in the hierarchy of diagnostic research, setting the stage for a future and planned validating study [31], as well as to gain insights about the time-course of sFlt-1 and VEGF-A release during the very initial phase of sepsis.

Conclusions

In conclusion, our study demonstrates that patients with hematological malignancies and post-chemotherapy FN that evolve to septic shock present higher levels of sFlt-1 and VEGF-A than patients with non-complicated sepsis, and that levels of these biomarkers correlate with sepsis severity scores. In addition, the time-course of sFlt-1 release suggests that is could represent a salvage compensatory mechanism in patients that evolve to septic shock. Additional studies are warranted to explore the validity of these observations, as well as the feasibility of their incorporation into risk stratification models for neutropenic patients or, in the future, as therapeutic tools in sepsis.

Acknowledgements

This study was financially supported by Fapesp and CNPq, Brazil. The Hematology and Hemotherapy Center - Hemocentro UNICAMP, forms part of the National Institute of Science and Technology of Blood, Brazil (INCT do Sangue CNPq/MCT/FAPESP).

Author details

¹Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. ²Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

Authors' contributions

BEA enrolled patients, recorded clinical data, performed laboratory analysis and contributed to manuscript production; SALM Performed laboratory analysis; FJPA performed statistical analysis and reviewed the manuscript; IL, CADS and JMA contributed to the study design and reviewed the manuscript; EVD designed the study, analyzed data and contributed to manuscript production. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 31 October 2010 Accepted: 3 March 2011

Published: 3 March 2011

References

- Ellis M: Febrile Neutropenia. *Ann N Y Acad Sci* 2008, **1138**:329-350.
- Pierrakos C, Vincent JL: Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care* 2010, **14**:R15.
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that increases vascular permeability in vivo and in vitro. *Science* 1983, **219**:983-985.
- Pickkers P, Sprong T, Eijk L, Hoeven H, Smits P, Deuren M: Vascular endothelial growth factor is increased during the first 48 hours of human septic shock and correlates with vascular permeability. *Shock* 2005, **24**:508-512.
- van der Flier M, van Leeuwen HJ, van Kessel KP, Kimpen JL, Hoepelman AI, Geelen SP: Plasma vascular endothelial growth factor in severe sepsis. *Shock* 2005, **23**:35-38.
- Shapiro NI, Yano K, Okada H, Fischer C, Howell M, Spokes KC, Ngo L, Angus DC, Aird WC: A prospective, observational study of soluble FLT-1 and vascular endothelial growth factor in sepsis. *Shock* 2008, **29**:452-457.
- Kendall RL, Wang G, Thomas KA: Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, **226**:324-328.
- Yano K, Liaw PC, Mullington JM, Shih SC, Okada H, Bodyak N, Kang PM, Tolt L, Belikoff B, Buras J, et al: Vascular endothelial growth factor is an important determinant of sepsis morbidity and mortality. *J Exp Med* 2006, **203**:1447-1458.
- Shapiro N, Schuetz P, Yano K, Sorasaki M, Parikh SM, Jones AE, Trzeciak S, Ngo L, Aird WC: The association of endothelial cell signaling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis. *Crit Care* 2010, **14**:R182.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ: ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. 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. 1992. *Chest* 2009, **136**:e28.
- Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, Bow EJ, Brown AE, Calandra T, Feld R, Pizzo PA, Rolston KV, Shenep JL, Young LS: 2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis* 2002, **34**:730-751.
- Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG: 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.
- Klasterky J, Paesmans M, Rubenstein EB, Boyer M, Elting L, Feld R, Gallagher J, Herrstedt J, Rapoport B, Rolston K, Talcott J: The Multinational Association for Supportive Care in Cancer risk index: A multinational scoring system for identifying low-risk febrile neutropenic cancer patients. *J Clin Oncol* 2000, **18**:3038-3051.
- Uys A, Rapoport BL, Anderson R: Febrile neutropenia: a prospective study to validate the Multinational Association of Supportive Care of Cancer (MASCC) risk-index score. *Support Care Cancer* 2004, **12**:555-560.
- Vidal L, Paul M, Ben-Dor I, Pokroy E, Soares-Weiser K, Leibovici L: Oral versus intravenous antibiotic treatment for febrile neutropenia in cancer patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2004, CD003992.
- Phillips B, Wade R, Stewart LA, Sutton AJ: Systematic review and meta-analysis of the discriminatory performance of risk prediction rules in febrile neutropenic episodes in children and young people. *Eur J Cancer* 2004, **40**:2950-2964.
- Kern WV: Risk assessment and treatment of low-risk patients with febrile neutropenia. *Clin Infect Dis* 2006, **42**:533-540.
- Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM: Constitutive expression of pVVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998, **97**:1114-1123.
- Harada M, Mitsuyma K, Yoshida H, Sakisaka S, Taniguchi E, Kawaguchi T, Ariyoshi M, Saiki T, Sakamoto M, Nagata K, et al: Vascular endothelial growth factor in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1998, **27**:377-380.
- Taha Y, Raab Y, Larsson A, Carlson M, Loof L, Gerdin B, Thörn M: Vascular endothelial growth factor (VEGF)-a possible mediator of inflammation and mucosal permeability in patients with collagenous colitis. *Dig Dis Sci* 2004, **49**:109-115.
- Karlsson S, Pettila V, Tenhunen J, Lund V, Hovilehto S, Ruokonen E: Vascular endothelial growth factor in severe sepsis and septic shock. *Anesth Analg* 2008, **106**:1870-1876.
- Jantunen E, S, Juutilainen A, Matilainen I, Kuitinen T, Ruokonen E, Koivula I, Jantunen E: Serum vascular endothelial growth factor in adult haematological patients with neutropenic fever: a comparison with C-reactive protein. *Eur J Haematol* 2009, **83**:251-257.
- Giuliano JS Jr, Lahni PM, Harmon K, Wong HR, Doughty LA, Carrillo JA, Zingarelli B, Sukhatme VP, Parikh SM, Wheeler DS: Admission angiopoietin levels in children with septic shock. *Shock* 2007, **28**:650-654.
- Kumpers P, Lukasz A, David S, Horn R, Hafer C, Faulhaber-Walter R, Fliser D, Haller H, Kielstein JT: Excess circulating angiopoietin-2 is a strong predictor of mortality in critically ill medical patients. *Crit Care* 2008, **12**:R147.
- Siner JM, Bhandari V, Engle KM, Elias JA, Siegel MD: Elevated serum angiopoietin 2 levels are associated with increased mortality in sepsis. *Shock* 2009, **31**:348-353.
- Alves BE, Montalvo SA, Aranha FJ, Siegl TF, Souza CA, Lorand-Metze I, Annichino-Bizzacchi JM, De Paula EV: Imbalances in serum angiopoietin concentrations are early predictors of septic shock development in patients with post chemotherapy febrile neutropenia. *BMC Infect Dis* 2010, **10**:143.
- Tsao PN, Chan FT, Wei SC, Hsieh WS, Chou HC, Su YN, Chen CY, Hsu WM, Hsieh FJ, Hsu SM: Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 protects mice in sepsis. *Crit Care Med* 2007, **35**:1955-1960.

28. Bagri A, Kouros-Mehr H, Leong KG, Plowman GD: Use of anti-VEGF adjuvant therapy in cancer: challenges and rationale. *Trends Mol Med* 16:122-132.
29. Schmucker C, Ehken C, Hansen LL, Antes G, Agostini HT, Lelgemann M: Intravitreal bevacizumab (Avastin) vs. ranibizumab (Lucentis) for the treatment of age-related macular degeneration: a systematic review. *Curr Opin Ophthalmol* 2010, **21**:218-226.
30. Kusumanto YH, Dam WA, Hospers GA, Meijer C, Mulder NH: Platelets and granulocytes, in particular the neutrophils, form important compartments for circulating vascular endothelial growth factor. *Angiogenesis* 2003, **6**:283-287.
31. Sackett DL, Haynes RB: The architecture of diagnostic research. *Bmj* 2002, **324**:539-541.

doi:10.1186/1479-5876-9-23

Cite this article as: Alves et al.: Time-course of sFlt-1 and VEGF-A release in neutropenic patients with sepsis and septic shock: a prospective study. *Journal of Translational Medicine* 2011 **9**:23.