



MAIARA MARX LUZ FIUSA

AVALIAÇÃO CLÍNICA DE PROTEÍNAS MODELADORAS DA
PERMEABILIDADE ENDOTELIAL COMO BIOMARCADORES
PARA ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO NA SEPSE EM
PACIENTES COM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS E
NEUTROPENIA FEBRIL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

MAIARA MARX LUZ FIUSA

**AVALIAÇÃO CLÍNICA DE PROTEÍNAS MODELADORAS DA
PERMEABILIDADE ENDOTELIAL COMO BIOMARCADORES
PARA ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO NA SEPSE EM
PACIENTES COM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS E
NEUTROPENIA FEBRIL**

Orientador: Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestra em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA MAIARA MARX LUZ FIUSA E ORIENTADA
PELO PROF. DR. ERICH VINICIUS DE PAULA.

Assinatura do Orientador

Campinas
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

F586a Fiusa, Maiara Marx Luz, 1987-
Avaliação clínica de proteínas modeladoras da permeabilidade endotelial como biomarcadores para estratificação de risco na sepse em pacientes com neoplasias hematológicas e neutropenia febril / Maiara Marx Luz Fiusa. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Angiopoietinas. 2. Moduladores da angiogênese. 3. Neoplasias. 4. Choque séptico. I. Paula, Erich Vinicius de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Clinical evaluation of modulators of endothelial permeability as biomarkers for risk stratification in sepsis patients with hematological malignancies and febrile neutropenia.

Palavras-chave em inglês:

Angiopoietins

Angiogenesis modulating agents

Neoplasms

Shock, Septic

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Erich Vinicius de Paula [Orientador]

Reinaldo Salomão

Rodrigo Nogueira Angerami

Data da defesa: 14-03-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

MAIARA MARX LUZ FIUSA

Orientador PROF. DR. ERICH VINICIUS DE PAULA

MEMBROS:

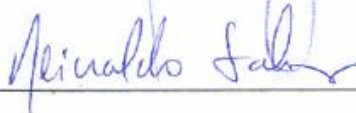
1. PROF. DR. ERICH VINICIUS DE PAULA



2. PROF. DR. RODRIGO NOGUEIRA ANGERAMI



3. PROF. DR. REINALDO SALOMÃO



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 14 de março de 2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai
e a minha família

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao meu pai pela companhia, bons conselhos, ajuda, enfim, por existir em minha vida e preencher todas as lacunas existentes com atenção, amor, cumplicidade e, acima de tudo, paciência dedicadas a mim durante todo esse período.

Agradeço também à minha família, em especial a minha Tia Marisa e minha avó Célia que estiveram continuamente ao meu lado me apoiando sempre que necessário.

Aos meus amigos de laboratório Vanessa, Aline Barnabé, Fernanda, Aline Urban, Mari, Bruna, Kiara, Laís, Rodolfo e Lucas, os quais me ajudaram muito na confecção deste trabalho e de muitos outros que já passaram.

A todos os funcionários do Laboratório de Hemostasia, que me ajudaram com as pesquisas e sanaram muitas dúvidas, em especial Tânia, Ricardo, Cristina e Devanira. Agradeço ao Laboratório de Terapia Gênica, em especial a Carolina Lanaro e Renata, pelos ensinamentos e proveitosas discussões.

Em especial agradeço meus mais que amigos, Gleice, Luis Fernando, Ucha, Silmara e Susan pela companhia, conselhos e ouvidos em todas as horas em que precisei!

E ao meu orientador Dr. Erich Vinicius de Paula, que durante esses anos me ensinou como ser uma pesquisadora dedicando muita paciência, ensinamentos, sábios conselhos e muito trabalho.

Um muito obrigado a todos estes acima citados, por tornarem este sonho possível.

Este estudo foi financiado com recursos fornecidos pela FAPESP, auxílio à pesquisa número 2011/02829-7, bolsa mestrado número 2011/03078-5 e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue/CNPq.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xxiii
ABSTRACT	xxvii
INTRODUÇÃO	31
1.1 - Sepses.....	33
1.1.1 - Definição e epidemiologia.....	33
1.1.2 – Fatores predisponentes	35
1.1.3 – Fisiopatologia da sepsis	37
1.2 – A barreira endotelial na saúde e na doença	42
1.2.1 – Mecanismos reguladores da barreira endotelial	44
1.2.2.- A angiogênese fisiológica como modelo para compreensão dos mecanismos de regulação da barreira endotelial	46
1.3 – Proteínas moduladoras da permeabilidade endotelial.....	48
1.3.1.- VEGF –A	48
1.3.2. - As angiopoietinas	52
1.4 - Neutropenia e sepsis	53
1.5 - Biomarcadores	56
1.5.1. Aspectos gerais	56
1.5.2. Moduladores da permeabilidade endotelial na sepsis	57
1.6 – Histórico e perspectivas futuras do manejo da sepsis	58
2 - OBJETIVOS	61
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	65

3.1 - Pacientes	67
3.2 - Definição de Seps e Estratificação de Risco	67
3.3 - Coleta de dados clínicos e laboratoriais	69
3.4 - Coleta e preparação das amostras de sangue	71
3.5 - Análise dos níveis séricos de VEGF-A e sFlt-1	71
3.6 - Análise dos níveis séricos de Ang-1 e Ang-2	72
3.7- Análise Estatística	72
4- RESULTADOS	75
4.1 - Características dos pacientes	77
4.2 – Avaliação dos níveis séricos de VEGF-A e sFlt-1, Ang-1 e Ang-2 em pacientes com neutropenia febril	80
4.2.1 - VEGF-A e sFlt-1	80
4.2.2 - Angiopietinas	82
4.3 - Correlação entre os níveis séricos de VEGF-A, sFlt-1, Ang-1 e Ang-2 e a gravidade da seps	85
4.3.1 - VEGF-A e sFlt-1	86
4.3.2 - Ang- 1 e Ang -2	86
4.4 - Estimativa da acurácia diagnóstica dos níveis séricos de VEGF-A, sFlt-1, Ang-1 e Ang-2	87
4.5 - Análises de risco relativo para evolução para choque séptico	89
4.6 – Sensibilidade e Especificidade da Relação das Angiopietinas como biomarcador	90
4.7 - Análise da mortalidade por choque séptico em 28 dias	91
5- DISCUSSÃO	95

5.1 – Aspectos gerais do uso de moduladores da permeabilidade endotelial como biomarcadores na sepse	97
5.2 – A importância dos estudos de validação de biomarcadores da sepse ..	101
5.3 – A relação Ang-2/Ang-1 como biomarcador do desenvolvimento de choque séptico em pacientes com neutropenia febril	104
6- CONCLUSÃO	109
6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
ANEXOS	125
Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	127
Anexo 2 – Artigo de Revisão publicado no periódico <i>Recent Patents on Biomarkers</i>	129
Anexo 3 – Artigo original relativo a este estudo, submetido para publicação.	135
Anexo 4 – Outras publicações com participação da aluna durante o mestrado	155

LISTA DE ABREVIATURAS

AJ	Junções “ <i>adherens</i> ” ou Junções aderentes
Ang	Angiopoietina
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
Flk-1	“ <i>Fetal liver kinase 1</i> ”; VEGFR-2
Flt-1	“ <i>Fms- like tyrosine kinase</i> ”; VEGFR-1
FWW	Fator de von Willebrand
IL	Interleucina
LBP	“ <i>LPS-binding protein</i> ”
LPS	Lipopolissacarídeo
MASCC	“Mutinational Association for Supportive Care in Cancer”
NET	“Neutrophil extracellular traps”
NF	Neutropenia febril
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Proteína C reativa
PRR	Receptores reconhecedores de padrão
SEMI	Sociedade européia de medicina intensiva
SRIS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SMI	Sociedade de medicina intensiva
SOFA	“Sequential organ failure assessment”
SSC	“ <i>Surviving sepsis campaign</i> ”
TCPH	Transplante de células progenitoras hematopoiéticas
Tie2	“ <i>Tirosyne kinase receptor 2</i> ”; receptor das angiopietinas

TJ	Junções “ <i>tight</i> ” ou Junções ocludentes
TLR	Toll-like receptores
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UTI	Unidade de terapia intensiva
VE	“ <i>Vascular endothelial</i> ”
VEGF	“ <i>Vascular endothelial growth factor</i> ”; fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR	Receptor do VEGF-A

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1- Componentes do sistema imune.....	37
Tabela 2- Escore MASCC.....	68
Tabela 3- Escore SOFA.....	69
Tabela 4- Características dos pacientes.....	79
Tabela 5- Correlação dos níveis séricos de VEGF, sFlt-1, Ang-1, Ang-2 e da relação Ang-2/Ang-1 com a gravidade da sepse.....	86
Tabela 6- Estimativa da acurácia diagnóstica dos níveis séricos de VEGF-A, sFlt-1, Ang-2 e da relação Ang-2/Ang-1	88
Tabela 7- Análise univariada do risco relativo para evolução para choque séptico de acordo com níveis da relação Ang-2/Ang-1.....	90
Tabela 8- Análise multivariada do risco relativo para evolução para choque séptico de acordo com níveis da relação Ang-2/Ang-1.....	90
Tabela 9- Análise do risco relativo para óbito de acordo com níveis da relação Ang-2/Ang-1	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Histórica da sepse.....	33
Figura 2- Mecanismo geral de ativação da resposta imune inata na sepse e suas potenciais consequências	38
Figura 3- Elementos fisiopatológicos da sepse	40
Figura 4- Esquema ilustrando as junções aderentes e junções ocludentes nas células endoteliais	46
Figura 5- A perda da integridade da barreira endotelial	48
Figura 6- Mecanismo de ação através do qual o VEGF-A controla a permeabilidade vascular	51
Figura 7- Sinalização da Angiopietina-Tie2 na manutenção da integridade da barreira endotelial.....	53
Figura 8- Ficha de coleta de dados	70
Figura 9- Fluxograma do estudo.....	78
Figura 10- Níveis séricos de VEGF-A em pacientes neutropênicos febris	81
Figura 11- Níveis séricos de sFlt-1 em pacientes neutropênicos febris.....	82
Figura 12- Níveis séricos de Ang-1 em pacientes neutropênicos febris	83
Figura 13- Níveis séricos de Ang-2 em pacientes neutropênicos febris	84
Figura 14- Níveis séricos da relação Ang-2/Ang-1 em pacientes neutropênicos febris	85
Figura 15- Curva de sobrevida dos pacientes de acordo com o valor do <i>cutoff</i> da relação Ang-2/Ang-1	92

Figura 16- Curva de sobrevida dos pacientes de acordo com o valor da mediana da relação Ang-2/Ang-1 93

A neutropenia febril (NF) em pacientes com neoplasias hematológicas é caracterizada pelo alto risco de sepse e choque séptico. Embora a utilização de escores clínicos como o MASCC permita a identificação de pacientes de baixo risco, este escore é menos informativo em pacientes de alto risco, onde se encaixam a maioria dos pacientes com neoplasias hematológicas, além daqueles submetidos a esquemas intensivos de quimioterapia. Ao mesmo tempo, a aplicação de biomarcadores de gravidade como a procalcitonina, validados em pacientes não-neutropênicos, é controversa em pacientes com NF. A quebra da barreira endotelial é um elemento chave no choque séptico, de modo que proteínas envolvidas neste processo são candidatos atrativos como biomarcadores de gravidade na sepse. Neste estudo, avaliamos prospectivamente o valor da dosagem de VEGF-A, sFlt-1, Ang-1 e Ang-2 como biomarcadores da evolução para choque séptico em 120 pacientes com NF. Pacientes internados nas enfermarias de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do HC da UNICAMP para tratamento de NF entre março de 2011 e 2012 foram convidados a participar. As amostras foram coletadas na manhã seguinte à entrada no estudo, junto com a coleta de exames de rotina. O estudo foi desenhado com o objetivo de mimetizar as condições de coleta e processamento das amostras, que seriam encontradas na prática clínica real. Foram avaliadas a evolução para choque séptico e mortalidade em 28 dias. Os resultados foram comparados com marcadores de prognóstico clássicos como proteína C reativa, e escores MASCC e SOFA. No total, 99 pacientes preencheram os critérios de inclusão, dos quais 19,8% evoluíram com choque séptico. Não foram observadas diferenças clínicas e demográficas entre os pacientes com NF não-complicada e choque séptico,

exceto pelo escore SOFA, significativamente mais elevado no segundo grupo. Os níveis de VEGF-A e sFlt-1 foram semelhantes entre os dois grupos. Em contraste, os níveis séricos de Ang-2 estavam aumentados em pacientes com choque séptico, ao passo que os níveis séricos de Ang-1 estavam diminuídos. Considerando o papel antagônico destas angiopoietinas na regulação da permeabilidade endotelial, a relação Ang-2/Ang-1 foi calculada, como indicador de desequilíbrios na concentração destes moduladores, que pudessem indicar um estado mais ou menos propenso à queda da barreira endotelial. De fato, um aumento na relação Ang-2/Ang-1 foi encontrada em pacientes com choque séptico (5,29 – variação de 0,58 a 57,14) em relação aos pacientes com NF não-complicada (1,99 – variação de 0,06 a 64,62; $P=0,01$). Na análise univariada e multivariada, a relação Ang-2/Ang-1 provou ser um fator de risco independente para o desenvolvimento de choque séptico e mortalidade em 28 dias. Desta forma, concluímos que a elevação dos níveis séricos de Ang-2 e da relação Ang-2/Ang-1 está associada ao risco aumentado de choque séptico e mortalidade em pacientes com NF, mesmo quando coletada sob condições próximas àquelas encontradas a prática clínica.

ABSTRACT

Febrile neutropenia (FN) in patients with hematologic malignancies is characterized by a high risk of sepsis complications and septic shock. Although the use of clinical scores such as the MASCC allows the identification of low-risk patients, this score is much less informative in high-risk patients, a category in which most patients with hematologic malignancies, and those undergoing intensive chemotherapy regimens, fit in. At the same time, the use of classical biomarkers such as procalcitonin in non-neutropenic patients is controversial in patients with FN. Endothelial barrier breakdown is a key element in septic shock, so that proteins involved in this process are attractive candidates as biomarkers of sepsis severity. In this study, we prospectively evaluated the value of VEGF-A, sFlt-1, Ang-1 and Ang-2 serum levels as biomarkers of progression to septic shock in 120 patients with FN. Patients hospitalized in the Hematology and Bone Marrow Transplantation in-patient units of a university hospital (HC-UNICAMP) for the treatment of FN between March 2011 and March 2012 were invited to participate. Samples were collected in the following morning after study entry, along with the collection of routine labs. The study was designed to mimic the conditions of blood sample collection and processing that would be encountered in “real-world” clinical practice. Clinical outcomes were (1) progression to septic shock and (2) death within 28 days from fever onset. Results were compared with classical prognostic markers such as C-reactive protein, and MASCC and SOFA scores. In total, 99 patients met the inclusion criteria, of which 19.8% progressed to septic shock. No differences clinical and demographic differences were observed between patients with uncomplicated-FN or septic shock, except for a higher SOFA score in the latter group. Levels of VEGF-A and sFlt-1 were similar between the two groups. In

contrast, serum levels of Ang-2 were increased in patients with septic shock, whereas serum levels of Ang-1 were decreased in these patients. Considering the antagonistic role of angiopoietins 1 and 2 in regulating endothelial permeability, the Ang-2/Ang-1 ratio was calculated as an indicator of imbalances in the concentration of these modulators. In fact, a high Ang-2/Ang-1 ratio was found in patients with septic shock (5.29 - range 0.58 to 57.14) compared to patients with uncomplicated FN (1.99 - range 0.06 to 64.62, $P = 0.01$). In univariate and multivariate analysis, the Ang-2/Ang-1 ratio proved to be an independent risk factor for the development of septic shock and for 28-day sepsis-related mortality. Thus, we concluded that a high Ang-2/Ang-1 ratio is associated with increased risk of septic shock and mortality in patients with FN, even when collected under conditions close to those encountered in real-world clinical practice.

INTRODUÇÃO

1.1 - Seps

1.1.1 - Definição e epidemiologia

A origem da palavra “seps” parece remontar a aproximadamente 2700 anos vindo, do grego “σηψις”, significando a “decomposição que o animal ou vegetal orgânico sofre na presença da bactéria” (Geroulanos e Douka, 2006). Porém somente em 1914 Shottmueller reportou que a liberação de germes patogênicos na corrente sanguínea era responsável por sinais e sintomas de inflamação sistêmica (teoria do germe) (Schottmueller, 1914). Avanços subsequentes levaram ao desenvolvimento de diretrizes rígidas para o diagnóstico da seps baseado na resposta do hospedeiro à infecção. Mais recentemente, a seps passou a ser conceituada como uma entidade multidimensional, englobando alterações orgânicas, teciduais, celulares e moleculares desencadeadas pelas interações patógeno-hospedeiro (Fig.1) (Namas et al., 2012).

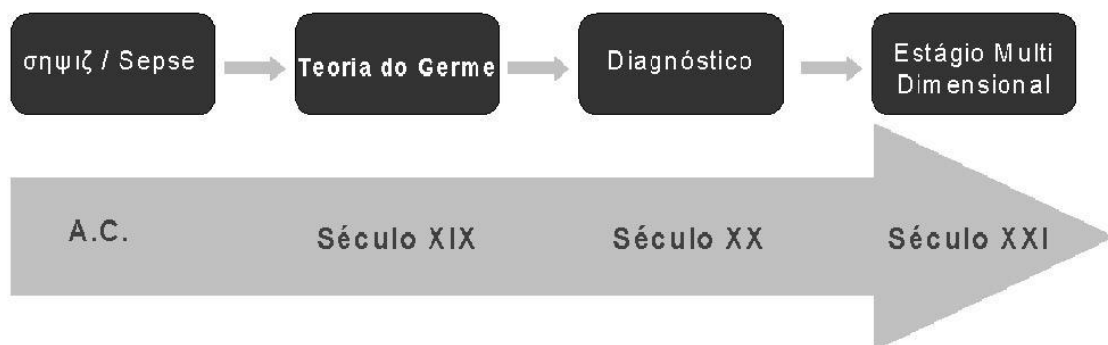


Figura 1. Histórico da Seps (Namas et al., 2012)

Em 1989, Bone et al. estabeleceram uma nova definição para sepse baseada em critérios clínicos específicos, concomitantes à presença de uma fonte conhecida de infecção. Mas, já em 1991, foi observado que estes mesmos sinais clínicos poderiam estar presentes com frequência em pacientes sem evidência de bacteremia, tais como vítimas de trauma grave e queimaduras. Ao mesmo tempo, tornava-se claro que a sepse estava associada a uma resposta inflamatória generalizada do organismo ao patógeno invasor, em geral distante do órgão ou tecido onde ocorrera o contato com este patógeno. Em conjunto, estas observações levaram à 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 Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico (Bone, 1992).

De acordo com estas definições, a SRIS é caracterizada pela presença de pelo menos dois dos seguintes critérios clínicos: (a) hipotermia (temperatura < 36°C) ou febre (temperatura $\geq$ 38°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/mm³) ou leucopenia (<4 mil leucócitos/mm³) ou > 10% de leucócitos imaturos no sangue periférico. Neste contexto, a sepse passa a ser definida como uma SRIS secundária a uma infecção (Bone, 1992). Cabe destacar que o diagnóstico microbiológico definitivo não é estabelecido em cerca de um terço ou mais dos pacientes com manifestações clínicas de sepse (Marshall e Reinhart, 2009), aceitando-se para a caracterização da etiologia infecciosa, a presença de

evidências clínicas ou laboratoriais de infecção. 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. Quando esta hipotensão é refratária à reposição volêmica adequada, o quadro é denominado de choque séptico (Bone, 1992).

A sepse grave e o choque séptico representam importantes problemas de saúde, afetando milhares de pessoas em todo mundo e, figurando como a principal causa de morte entre pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) não coronarianas. 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. Estatísticas do início dos anos 2000 mostravam que nos Estados Unidos ocorriam 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).

1.1.2 – Fatores predisponentes

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), hábitos (ingestão abusiva de álcool) e o uso de novas tecnologias (presença de dispositivos de acesso venoso, quimioterapia, imunossupressão) são alguns exemplos (O'Brien et al., 2007; Williams et al., 2004).

A importância do câncer como fator de risco é confirmada pelo fato de que a 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 outros autores 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 levantado por estes autores 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).

O risco aumentado de complicações da sepse em pacientes com câncer é multifatorial, e envolve fatores como a caquexia do câncer, a necessidade de vários procedimentos invasivos e a imunossupressão da doença e do tratamento quimioterápico (McMillan, 2009). De todos estes fatores, um dos mais relevantes é

a neutropenia febril causada pela quimioterapia (Andre et al., 2010; Legrand et al., 2012).

1.1.3 – Fisiopatologia da sepse

Embora o mecanismo desencadeante da sepse esteja relacionado à exposição do hospedeiro a patógenos invasores, a grande maioria das manifestações clínicas da sepse não são causadas diretamente pelo patógeno, mas sim pela resposta do hospedeiro a esta invasão. Esta resposta envolve os dois componentes clássicos do sistema imune, designados resposta imune inata e adaptativa (Tabela 1).

Tabela 1. Componentes do sistema imune

Resposta imune inata	Resposta imune adaptativa
Resposta inespecífica	Resposta antígeno e patógeno-específica
Exposição leva a estímulo estereotipado e máximo	Há intervalo entre estímulo e resposta e gradação de intensidade
Envolve componentes humorais e celulares	Envolve componentes humorais e celulares
Não há memória imunológica	Gera resposta imunológica
Presente em quase todas as formas de vida	Presente em vertebrados

O papel da resposta imune inata é desencadear, de forma imediata, uma série de alterações moleculares e celulares que constituem a linha inicial de defesa, cujo objetivo é eliminar ou reduzir os danos causados pelo patógeno

invasor. De acordo com o entendimento atual da fisiopatologia da sepse, esta ativação é em geral benéfica, levando à eliminação do patógeno e cura. No entanto, devido a mecanismos ainda pouco entendidos, em alguns casos esta resposta ocorre de forma exacerbada e desregulada, tornando-se por si só o principal mecanismo patogênico da sepse (Seeley et al., 2012) (Figura 2).

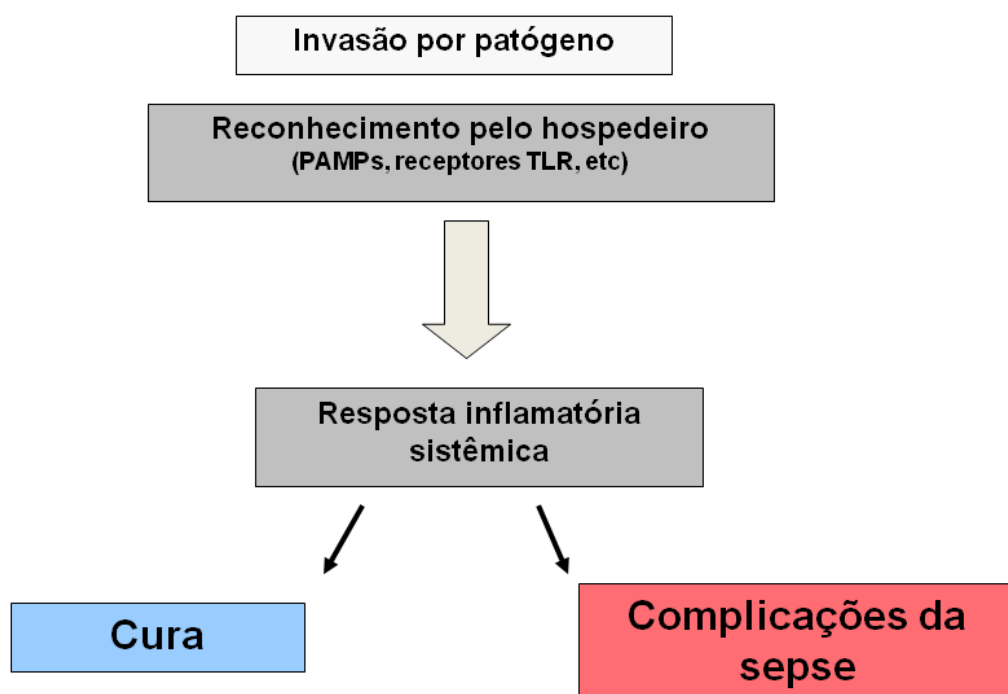


Figura 2: Mecanismo geral de ativação da resposta imune inata na sepse e suas potenciais consequências.

Estudos sobre o papel patogênico de bactérias Gram negativas, ou mais especificamente do principal componente de suas paredes celulares – os lipopolissacárides (LPS), em modelos animais de sepse levaram a um melhor

entendimento do papel da resposta imune inata nesta condição. O LPS, uma endotoxina abundante na parede celular das bactérias Gram negativas, desempenha um papel chave na sepse e no choque séptico devido seus efeitos na resposta imune inata. A compreensão deste papel envolveu a descoberta de proteínas que funcionam como sensores moleculares para a presença de elementos estruturais conservados em patógenos invasores. Estes receptores são conhecidos como PRR (receptores reconhecedores de padrões) e incluem a LBP (*LPS-binding protein*), o CD14, e os receptores Toll-like (TLR), entre outros. Do lado dos patógenos, os elementos estruturais reconhecidos pelos PRR são coletivamente chamados de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), e incluem a flagelina, o ácido lipotecóico, as histonas e outras variantes de ácidos nucleicos. O LPS é na verdade o exemplo prototípico desta classe. (Fig.3). (Aderem e Ulevitch, 2000; Salomao et al., 2012). O LPS se liga a receptores da resposta imune inata como o CD14 e o TLR-4, levando à expressão de genes pró-inflamatórios, e ao conjunto de alterações moleculares e celulares que caracterizam a resposta do hospedeiro à infecção. Em linhas gerais, esta resposta é caracterizada por: liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias, ativação de neutrófilos e monócitos, ativação do sistema complemento, ativação da coagulação e ativação endotelial, termo genérico que será mais detalhado a seguir (Fig. 3) (Aird, 2003; Cohen, 2002).

A importância da ativação da resposta imune inata como mecanismo de lesão na sepse é bem ilustrada pela demonstração de elevadas taxas de mortalidade na SRIS, que 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 foi capaz de melhorar a sobrevida dos pacientes com sepse, reforçando a presença de mecanismos não relacionados à proliferação do patógeno na fisiopatologia desta condição (Angus et al., 2000).

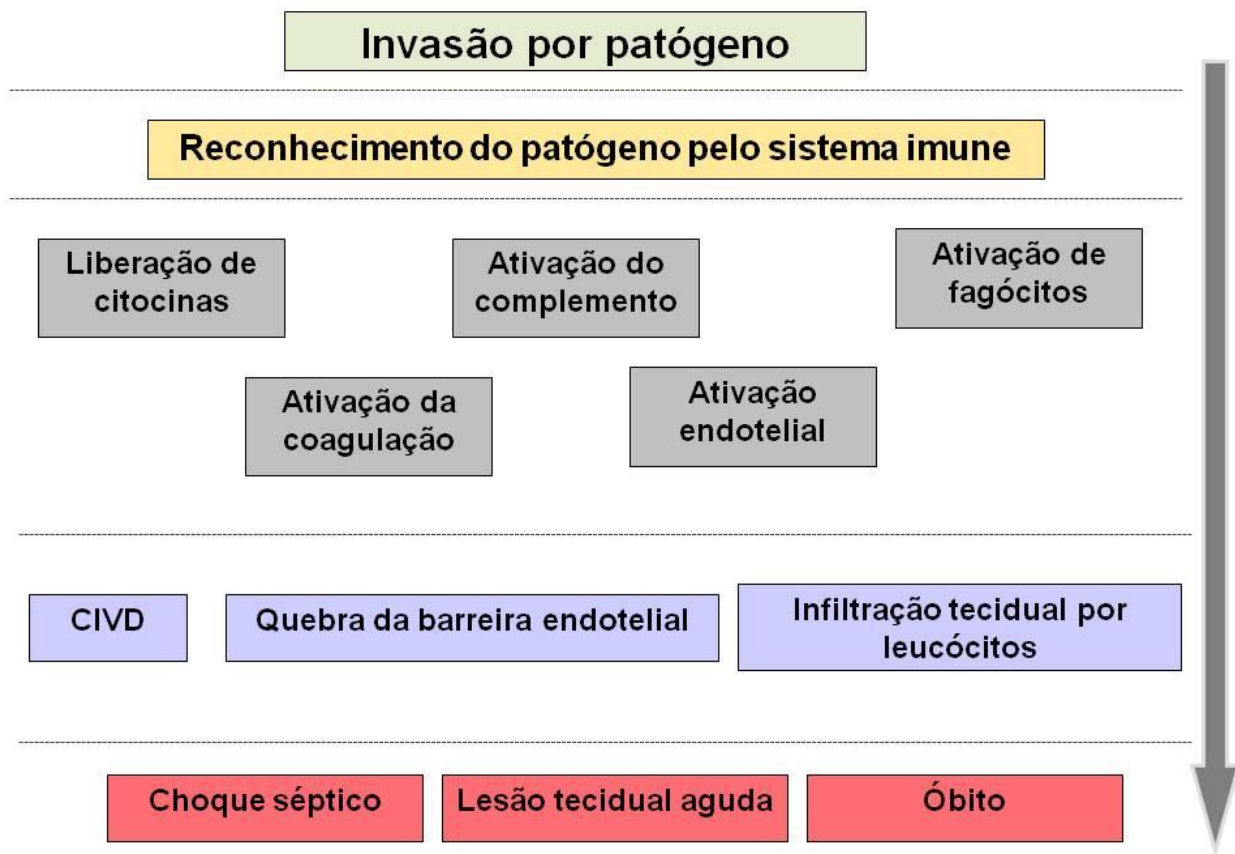


Figura 3. Elementos fisiopatológicos da sepse. Esquema ilustrando a fisiopatologia da sepse, como destaque para os elementos que constituem a resposta do hospedeiro à infecção (em cinza). Quando exacerbados, estes elementos podem levar à complicações da sepse (em vermelho). A seta indica a sequencia usual de eventos.

A ativação da resposta imune inata pelo LPS é um mecanismo presente na evolução há pelo menos 250 milhões de anos, a partir das evidências obtidas no estudo de um invertebrado conhecido como caranguejo- ferradura, o *Limulus polyphemus*. Este artrópode habita regiões costeiras, estando desta forma sob constante ameaça de quebra de sua carapaça. Talvez por esta pressão do meio, este animal desenvolveu um sistema de resposta rápida contra rupturas do tegumento baseado na quimiotaxia de células mononucleares ao local da lesão, que previnem a entrada de água no organismo, evitando assim a desintegração e infecção do meio interno. A fim de detectar a presença de água, este sistema é ativado por uma substância presente em algas azuis, ou cianobactérias (procariontes existentes há cerca de 3 bilhões de anos), que é o LPS. Acredita-se que este sistema de resposta rápida ativado por LPS possa ter evoluído e dado origem a sistemas análogos de detecção de invasão e de perda da integridade estrutural, também organizados sob a forma de cascatas, tais como a resposta imune inata e a hemostasia. (Opal, 2000).

Em resumo, podemos entender que a sepse representa o conjunto de alterações clínicas e laboratoriais iniciados por uma resposta imune inata cujo objetivo é controlar e eliminar patógenos ou elementos potencialmente danosos à integridade do organismo. Em geral, esta resposta inclui: (1) ativação local da coagulação, cujo benefício pode ser o de restringir a disseminação da infecção; (2) ativação global do sistema imunológico, com aumento da produção de citocinas inflamatórias e da atividade citotóxica e fagocítica; e (3) ativação endotelial, cujos benefícios imediatos podem ser a facilitação da chegada de fagócitos ao sítio da infecção por aumento da adesão e facilitação da transmigração aos tecidos. De

acordo com este modelo fisiopatológico, podemos imaginar que a lesão tecidual e as consequências clínicas da sepse grave decorrem da exacerbação de cada um destes processos, que clinicamente se apresentaria como CIVD, tempestade de citocinas e desintegração da barreira endotelial. (Seeley et al., 2012).

É sobre esta última consequência que discutiremos a seguir.

1.2 – A barreira endotelial na saúde e na doença

O endotélio é a estrutura localizada na interface entre tecidos e sangue. Sob condições fisiológicas, as células endoteliais exercem diversas funções cujo objetivo central é a manutenção das propriedades anticoagulantes desta camada, permitindo que a fluidez do sangue seja preservada. No entanto, este equilíbrio pode ser perturbado por uma série de alterações patológicas, com consequências tão distintas quanto as trombozes, a aterosclerose, além de várias condições associadas à inflamação. Uma outra função fundamental do endotélio é a separação entre o conteúdo do plasma e os tecidos, função conhecida como barreira endotelial. Um dos exemplos mais bem estudados de condição patológica associada à quebra desta barreira é o edema cerebral inflamatório. Nesta situação, insultos como trauma ou inflamação levam à perda da função de barreira endotelial no sistema nervoso central, edema tecidual e aumento da pressão intersticial. Como consequência, pode haver redução da perfusão tecidual, isquemia e extensão do dano cerebral. O edema cerebral inflamatório ilustra bem o papel de estímulos inflamatórios como indutores da quebra da barreira endotelial (Dejana et al., 2009). No entanto, a quebra da barreira endotelial pode também

ocorrer como parte de mecanismos fisiológicos, ou ainda como um aspecto positivo da resposta do organismo a estímulos inflamatórios, contribuindo para a eliminação do insulto original.

O melhor exemplo do primeiro caso é o processo de angiogênese que ocorre no embrião. Neste processo, a barreira endotelial dos tubos endoteliais primários, formados a partir da justaposição simples destas células, são constantemente montados e desmontados, para que novos brotos vasculares sejam incorporados, dando origem à árvore vascular adulta. Por sua importância para os objetivos de nosso estudo, os mecanismos fisiológicos da angiogênese no embrião serão descritos mais adiante em detalhe (Fagiani e Christofori, 2013).

Em relação à segunda situação, o melhor exemplo é a resposta do organismo a um patógeno invasor, referida genericamente como “ativação endotelial”. Nesta situação, ocorrem modificações em locais específicos do endotélio, facilitando a adesão e a diapedese de leucócitos, a qual exige a quebra localizada e transitória da barreira endotelial. Quando regulada e localizada, esta quebra pode ser vista como o passo inicial de etapas críticas do arsenal de defesa do hospedeiro frente a uma infecção tais como a fagocitose ou citotoxicidade contra patógenos por neutrófilos, monócitos e outros leucócitos, e a formação de redes compostas por neutrófilos e fibrina (NETs), que auxiliam na contenção de um foco infeccioso (Seeley et al., 2012). Assim como no caso da ativação da coagulação e de outros elementos da resposta inflamatória na sepse, poderá ser a ativação desregulada e sistêmica de um mecanismo potencialmente benéfico, a

responsável por uma das complicações mais temidas de um processo infeccioso, que é o choque séptico.

1.2.1 – Mecanismos reguladores da barreira endotelial

A permeabilidade vascular é mediada por pelo menos 2 mecanismos: as chamadas vias transcelular e paracelular (Dejana et al., 2008). O primeiro inclui um sistema de transporte vesicular, fenestras e transporte bioquímico. O segundo, mais bem estudado e possivelmente mais importante na fisiopatologia da sepse, é controlado pela abertura e fechamento dinâmico das junções entre as células endoteliais (Dejana et al., 2008).

As células endoteliais possuem pelo menos 2 regiões especializadas com função adesiva: as junções aderentes (Adherens junctions - AJ) e as junções ocludentes ("tight junctions - TJ) (Dejana et al., 2009). As AJs iniciam o contato célula-célula durante o desenvolvimento do sistema vascular, e promovem a maturação e manutenção da barreira endotelial. As TJs, por sua vez, regulam a passagem de íons e solutos através do caminho paracelular. Um aspecto importante é que ambas podem transferir sinais extra-celulares para dentro da célula, ativando vias de sinalização que podem levar à quebra ou manutenção da barreira endotelial. (Bazzoni e Dejana, 2004; Gonzalez-Mariscal et al., 2008; Matter e Balda, 2003). Estes estímulos incluem variações no *shear stress*, que exigem a adaptação contínua da monocamada endotelial às condições dinâmicas vigentes, e a inflamação.

Neste contexto, as AJs, e sua principal proteína estrutural, a VE-caderina, exercem um papel central no controle da integridade da barreira endotelial durante

o desenvolvimento embrionário do sistema vascular. A VE-caderina é uma proteína transmembrana que forma uma estrutura em forma de zíper ao estabelecer contatos em *cis* e em *trans* entre células endoteliais adjacentes. Sua importância no controle da permeabilidade endotelial é ilustrada pelo efeito de anticorpos bloqueadores contra a VE-caderina em cultura celular e em camundongos, que levam a profundas alterações na permeabilidade vascular nos pulmões e coração (Corada et al., 1999) . Fisiologicamente, os mecanismos pelos quais a VE-caderina controla a permeabilidade da barreira endotelial parece ao menos em parte ligado a sua ligação a uma proteína intra-celular, a p120 catenina (p120). Estudos em culturas de células demonstraram que a liberação da p120 de seu sítio de ligação com a VE-caderina leva à internalização desta, com desestabilização da barreira endotelial (Xiao et al., 2005) (Fig. 4). Estudos recentes mostraram que agentes pró-inflamatórios presentes na sepse como o TNF-alfa e o VEGF-A podem levar à liberação da p120, contribuindo para a quebra da barreira endotelial (Angelini et al., 2006; Esser et al., 1998). O papel deste mecanismo na sepse ainda não foi demonstrado.

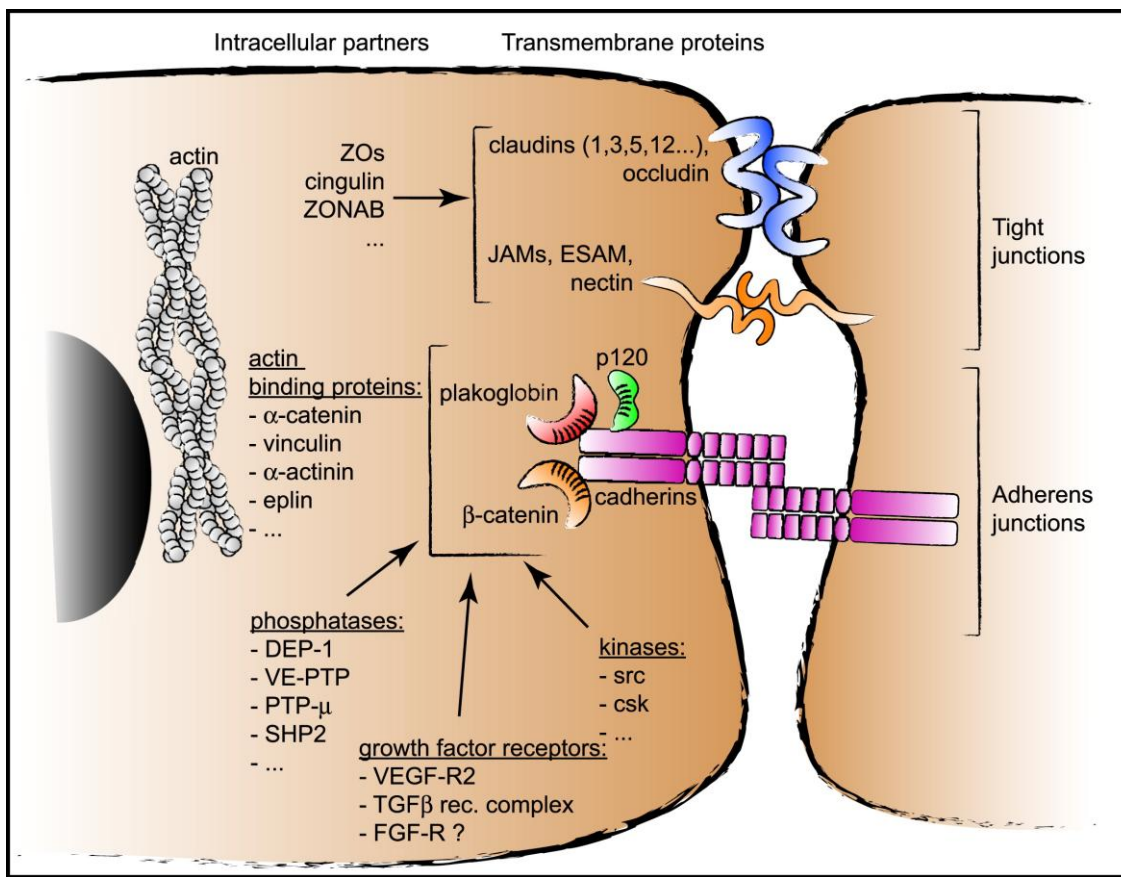


Figura 4: Esquema ilustrando as junções aderentes e as junções ocludentes nas células endoteliais (Dejana et al., 2009)

1.2.2.- A angiogênese fisiológica como modelo para compreensão dos mecanismos de regulação da barreira endotelial

Três importantes mecanismos celulares estão envolvidos na formação da vasculatura: a vasculogênese, a angiogênese e a arteriogênese. Durante a embriogênese, os primeiros vasos embrionários se desenvolvem através da vasculogênese, que consiste na justaposição simples de células endoteliais, formando tubos vasculares primitivos (Risau e Lemmon, 1988; Thomas e Augustin, 2009). A este processo segue-se a angiogênese, que consiste na

formação inicial de artérias e veias a partir destes tubos primitivos, ocorrendo pelo brotamento de novos vasos, ou pela divisão do vaso existente (Djonov et al., 2000) (Adams e Alitalo, 2007). Finalmente, a arteriogênese consiste no processo de maturação de artérias e veias, a partir da aposição de pericitos e células musculares lisas (Patel-Hett e D'Amore, 2011). Todos estes processos são finamente regulados por uma série de fatores de crescimento e fatores de transcrição, entre os quais o VEGF-A e as angiopoietinas, exercem papéis fundamentais (Saharinen et al., 2010; Saharinen et al., 2011). Como mencionado anteriormente, o processo de angiogênese exige a quebra e o restabelecimento constante e finamente regulado dos contatos entre células endoteliais adjacentes, para a incorporação de novos brotos vasculares, envolvendo as AJs e a VE-caderina. O estudo detalhado destes mecanismos permitiu a identificação de mediadores críticos da regulação da barreira endotelial que serão discutidos a seguir.

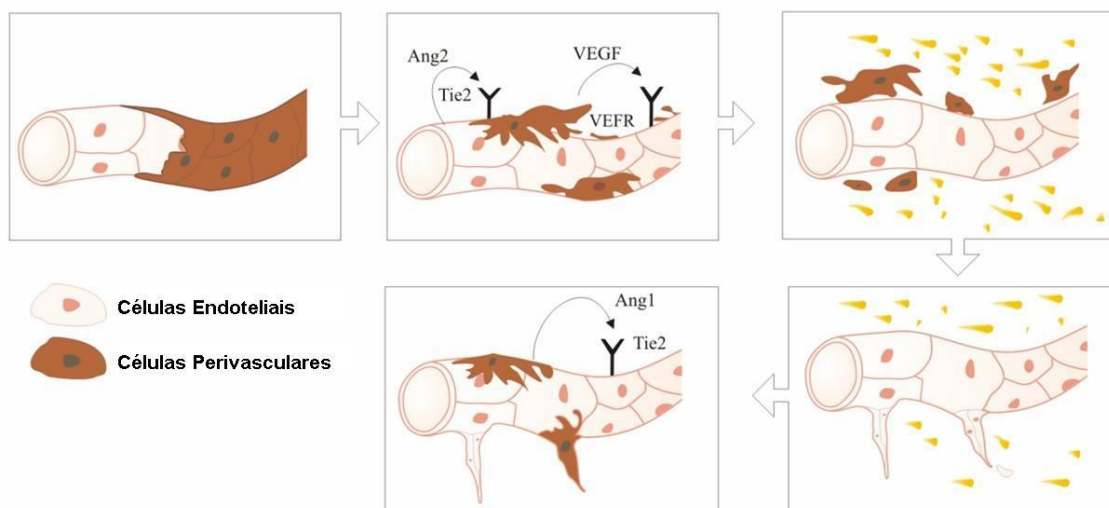


Figura 5. A perda da integridade da barreira endotelial. . Modulação da integridade da barreira endotelial durante a angiogênese no embrião. Esquema ilustrando o processo de quebra da barreira endotelial para permitir a incorporação de novos vasos. A ligação do VEGF-A e da angiopoietina 2 a seus receptores leva à desestabilização das junções entre células endoteliais. Com isso há um aumento da permeabilidade que promove não somente o extravasamento de proteínas plasmáticas, mas também a migração de células endoteliais que formarão o broto vascular primitivo. Porém para que esse vaso recém formado se torne funcional é necessário que integridade do vaso seja restabelecida e isso é garantido pela Ang-1, que ao se ligar ao receptor Tie-2 refaz e restabelece as junções e recruta as células perivasculares torando este vaso funcional.

1.3 – Proteínas moduladoras da permeabilidade endotelial

1.3.1.- 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 (Byrne et al., 2005; Ferrara et al., 2003).

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) (Fig. 6).

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; Shapiro et al., 2008; van der Flier et al., 2005). Estes dados sugerem que os mesmos mecanismos utilizados para a quebra fisiológica da barreira endotelial no embrião possam ser ativados em situações patológicas extremas como a sepse.

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 .

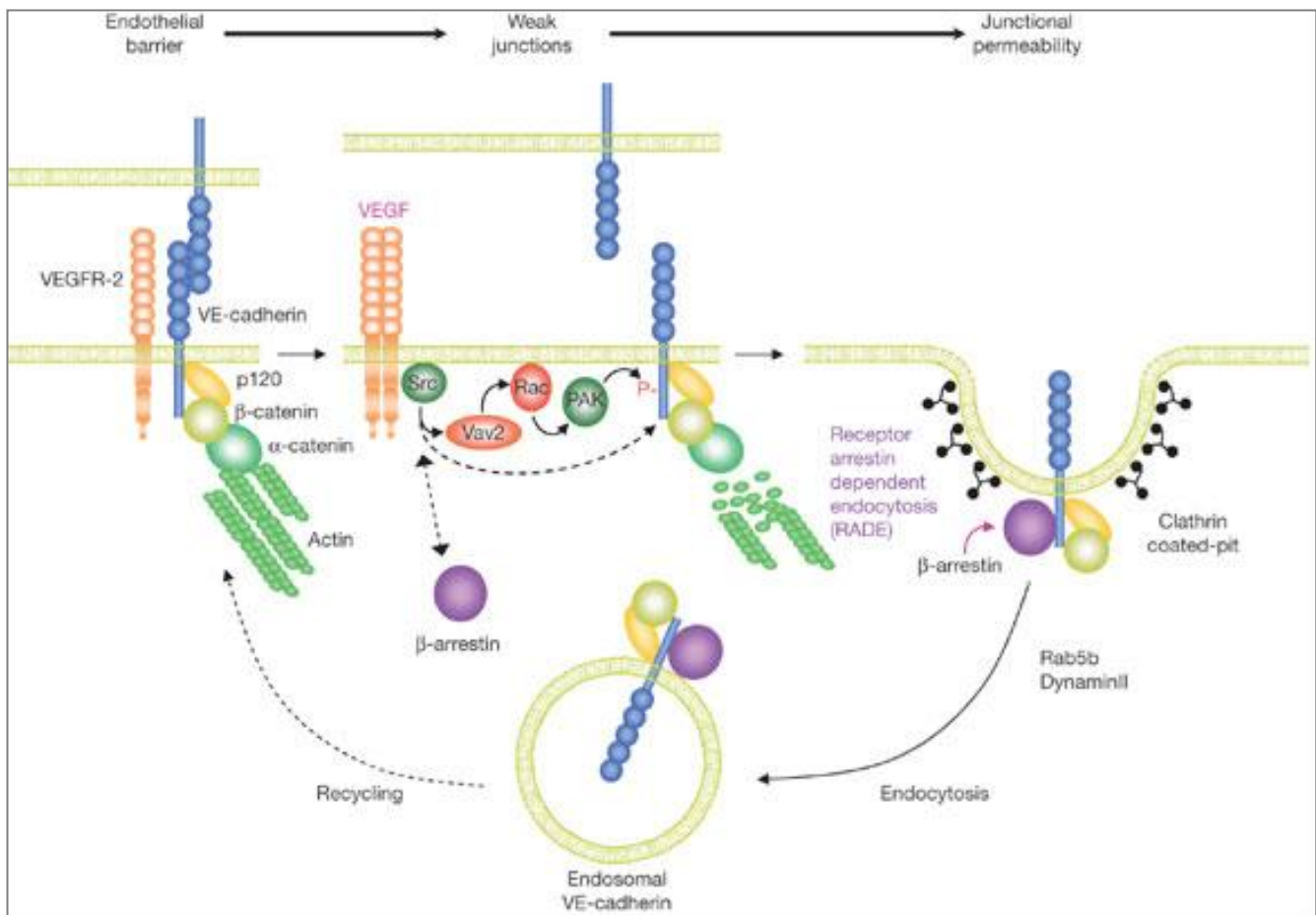


Figura 6. Mecanismo de ação através do qual o VEGF-A controla a permeabilidade vascular. - Esquema ilustrando o mecanismo molecular através do qual o VEGF-A promove a internalização da VE-caderina e a permeabilidade vascular. A barreira endotelial é mantida pela integridade das junções intercelulares do tipo “adherens”, constituídas pela interação entre as “VE-cadherin” de duas células vizinhas. A ligação do VEGF-A ao receptor VEGFR-2 ativa vias de sinalização que levam à internalização da VE-caderina (Gavard e Gutkind, 2006)

1.3.2. - As angiopoietinas

As angiopoietinas (Ang) constituem uma família de fatores de crescimento de aproximadamente 70kDa 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 que promovem a interação entre as células endoteliais e a matriz extracelular, fornecendo 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. (Fig. 7) (Thurston et al., 2000).

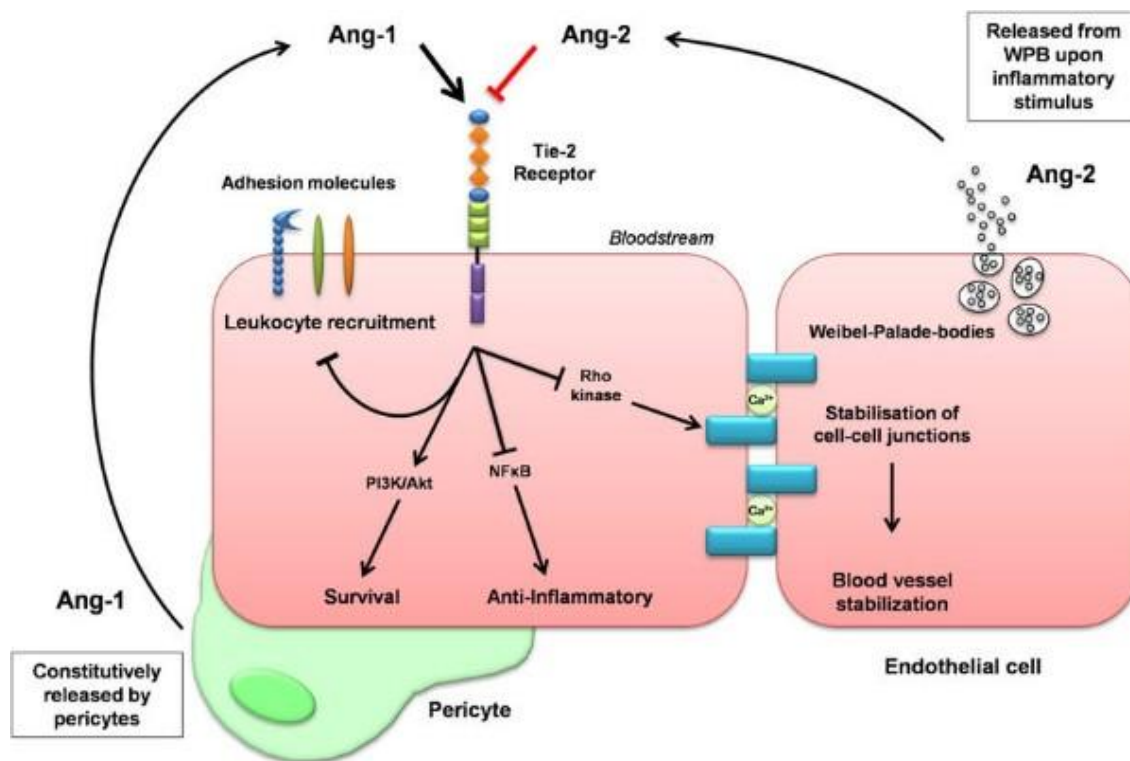


Figura 7. Sinalização Angiopoietinas- Tie2 na manutenção da integridade da barreira endotelial. Esquema ilustrando a sinalização Ang-Tie2. A Ang-1, produzida por células perivasculares, se liga ao receptor Tie2 induzindo sua fosforilação e promovendo entre outras ações, a inibição da sinalização mediada 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. ([http:// www.angiopoietin.de / pageID _ 6911126.html](http://www.angiopoietin.de/pageID_6911126.html)).

1.4 - 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 grave resultante de toxicidade hematológica dos quimioterápicos e/ou da substituição da medula óssea por células neoplásicas é definida como contagem de neutrófilos menor ou igual a 500/ μ l e representa o mais importante fator de risco de infecção nestes pacientes. Este risco é determinado pela intensidade da neutropenia (mais pronunciado com contagens inferiores a 100/ μ l) e pela sua duração e ambos também influenciam diretamente a gravidade do quadro clínico (Bodey et al., 1996).

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 e óbito, 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 (Hughes et al., 2002).

O prognóstico de pacientes com neutropenia e sepse grave ou choque séptico foi recentemente avaliado em um estudo retrospectivo francês com 428 pacientes ao longo de 11 anos. A mortalidade hospitalar nesta população foi de 49,8%, e os preditores de melhora da sobrevida incluíram o uso de antibióticos aminoglicosídeos e a remoção precoce de cateteres (Legrand et al., 2012).

Em estudo preliminar de nosso grupo de pesquisa, os níveis de VEGF-A, s-Flt-1, Ang-1 e Ang-2 foram avaliados em uma situação controlada, em 44 pacientes através de 3 coletas seriadas: (1) antes do início da quimioterapia, (2) no momento da febre e (3) 48 horas após o pico febril. Níveis elevados de VEGF, s-Flt-1, Ang-2 e da relação Ang-2/Ang-1 foram encontrados 48 horas após o pico febril (Alves et al., 2011; Alves et al., 2010).

1.5 - Biomarcadores

1.5.1. Aspectos gerais

Um biomarcador é definido como “...uma característica objetivamente mensurada como um indicador de um processo biológico normal, processos patogênicos ou resposta farmacológica à uma intervenção terapêutica” (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Apesar de mais de 100 distintas moléculas propostas como biomarcadores na sepse, nenhum biomarcador, sozinho ou combinado, foi incorporado de forma ampla ao manejo clínico da sepse.

Segundo Marshall e Reinhart, um biomarcador pode desempenhar diversos papéis: identificar um paciente com maior risco de desenvolvimento de complicações de uma doença, estabelecendo prognóstico; identificar a presença de um processo ou estado patológico, estabelecendo diagnóstico; e agregar valor ao processo de diagnóstico ou prognóstico tornando-os mais confiáveis, rápidos e custo-efetivo (Marshall e Reinhart, 2009).

No entanto, o estabelecimento de um biomarcador como uma ferramenta de utilidade clínica não é um processo simples, e envolve uma série de etapas que devem ser respeitadas para que o resultado final seja confiável e reproduzível. Em uma publicação clássica de 2002, Sackett & Haynes descreveram elegantemente as linhas gerais deste processo, dividindo-os conforme a pergunta científica abordada em cada etapa (Sackett e Haynes, 2002).

A primeira etapa deste processo consiste na demonstração de diferença na concentração de um biomarcador entre pacientes e indivíduos saudáveis,

referido na publicação acima como uma “pergunta de fase 1”. A etapa seguinte, geralmente realizada em conjunto com a primeira, é a demonstração de diferenças na concentração de um biomarcador entre grupos distintos de um mesmo universo de pacientes, tais como pacientes com melhor ou pior prognóstico (pergunta de fase 2). Estudos que abordam estas perguntas são geralmente realizados em número pequeno e homogêneo de pacientes, e em condições experimentais muito bem controladas, diferentes do que ocorre na prática diária. Por esta razão, estes estudos devem ser sempre validados em condições mais próximas da chamada “vida real”, em que a performance dos testes é “desafiada” por situações como aumento da variabilidade na coleta e na forma de processamento de amostras, origem distinta dos pacientes (estudos multicêntricos), limitação dos critérios de exclusão. Referida como pergunta de fase 3, o objetivo destes estudos é avaliar se resultados preliminares se sustentam quando expostos às condições encontradas na prática. Finalmente, os estudos que correlacionam a utilização de um biomarcador com modificações no manejo e com impactos em prognóstico (sobrevida, qualidade de vida, entre outros) e custo, responderiam às chamadas perguntas de fase 4, conforme esta proposta de arquitetura de estudos de acurácia diagnóstica (Sackett e Haynes, 2002).

1.5.2. Moduladores da permeabilidade endotelial na sepse

Uma revisão recente analisou 61 artigos sobre o uso de marcadores de ativação endotelial na sepse, e sugeriu que dentre todos os sistemas avaliados, as angiopoetinas seriam os mais promissores (Xing et al., 2012). Outra revisão,

realizada por nosso grupo, mostra o interesse crescente nesta classe de biomarcadores a partir da análise de patentes submetidas nos últimos anos (Fiusa et al., 2012). Esta revisão mostra ainda uma tendência de avaliação de painéis de biomarcadores, com o objetivo de aumentar a acurácia diagnóstica e a aplicabilidade clínica dos mesmos. No entanto, é importante destacar que estudos com pacientes com neutropenia febril foram excluídos destas revisões, de modo que a aplicabilidade desta informação ao contexto de pacientes com câncer e neutropenia febril é questionável. Como destacado anteriormente, estudos preliminares de nosso grupo, utilizando metodologias que permitem a abordagem de perguntas de fase 1 e 2 do modelo de Sackett & Haynes, confirmaram o potencial da dosagem de VEGF-A, sFlt-1, e das Ang-1 e Ang-2 como biomarcadores na sepse.

No conjunto, estes dados justificam o interesse em validar nossos resultados preliminares em uma população independente, e utilizando um desenho de estudo capaz de gerar resultados mais aplicáveis à realidade clínica.

1.6 – Histórico e perspectivas futuras do manejo da sepse

Ao longo das últimas décadas, a melhora progressiva da compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da sepse, assim como a ampliação do número de estudos demonstrando o benefício potencial de algumas medidas de suporte genéricas adotadas em UTIs, permitiram que fosse construída uma proposta de abordagem sistematizada da sepse. O projeto “Surviving Sepsis Campaign” (SSC) teve suas raízes fundamentadas em uma iniciativa realizada pelo Fórum Internacional de Sepse, posteriormente ampliada por um grupo de investigadores

da área (Marshall et al., 2010). O primeiro conjunto de recomendações sob a forma de diretrizes para tratamento da sepse foi publicado pelo grupo em um suplemento para a revista *Intensive Care Medicine* (Jimenez e Marshall, 2001), e levou ao lançamento de uma campanha, encampada pelas Sociedade de Medicina Intensiva (SMI) e pela Sociedade Europeia de Medicina Intensiva (SEMI), cujo objetivo era o de aumentar o conhecimento médico a respeito do diagnóstico e do tratamento da sepse, tendo como expectativa melhorar o prognóstico desses pacientes. Nos anos seguintes, as recomendações foram sintetizadas e atualizadas (Dellinger et al., 2008; Marshall et al., 2004), e a SSC foi lançada aos profissionais em UTIs e serviços de emergência em todo o mundo, tendo sido oficialmente concluída em 2008. Apesar do mérito de ter dado início ao processo de sistematização de evidências em uma área tão crítica, a SSC foi motivo de muitos questionamentos em relação ao papel do financiador principal, um laboratório que comercializava um produto cuja adoção fazia parte das recomendações da SSC (Eichacker et al., 2006; Marshall et al., 2010). A despeito das críticas, umas mais e outras menos justificadas, a SSC e suas consequências apresentaram um saldo positivo, ao demonstrarem que a promulgação de estratégias de manejo clínico baseadas em evidências, e de forma transparente, podem induzir mudanças positivas na prática clínica, com impactos mensuráveis na sobrevida dos pacientes (Ferrer et al., 2008; Levy et al., 2010).

Um outro processo paralelo aos esforços de sistematização de medidas genéricas para tratamento da sepse foi a busca por terapias alvo-específicas, baseadas na descoberta de pontos supostamente críticos em sua fisiopatologia. Assim, baseados em achados de estudos em modelos animais, e em estudos de

fase 1 e fase 2, foram realizados vários grandes estudos multicêntricos de fase 3 testando moléculas como anticorpos anti-TNF-alfa (Abraham et al., 1995), anticoagulantes naturais (Abraham et al., 2003; Ranieri et al., 2012; Warren et al., 2001), inibidores de receptores TLR (fase 2) (Tidswell et al., 2010), entre outros. Infelizmente, os resultados destes estudos não reproduziram os achados obtidos nas fases preliminares, de modo que a sepse permanece uma condição que, a despeito da importância epidemiológica e gravidade, não possui em seu arsenal terapêutico terapias alvo-específico eficazes, ao contrário de áreas como a oncologia, reumatologia, entre outras.

Entre as conseqüências mais imediatas destes resultados podemos citar: (i) um retorno à bancada na tentativa de adquirir uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da sepse e identificar novos alvos terapêuticos; e (ii) uma avaliação crítica dos estudos negativos, com foco na identificação de subgrupos de pacientes que pudessem responder melhor a determinadas terapias.

Contextualizando os objetivos de nosso trabalho ao momento atual descrito acima, é possível afirmar que: (i) a quebra da barreira endotelial representa um dos novos alvos terapêuticos a serem explorados no tratamento da sepse (Goldenberg et al., 2011); e (ii) a disponibilidade de novos biomarcadores relacionados a processos fisiopatológico específicos como a quebra da barreira endotelial poderia ser útil, não apenas para auxiliar no manejo de pacientes com sepse, mas também, para identificar subgrupos de pacientes dentro da grande heterogeneidade que caracteriza a população de pacientes com sepse.

2 - OBJETIVOS

Este trabalho teve como **objetivo** caracterizar variações nos níveis de um painel de mediadores envolvidos no aumento da permeabilidade microvascular na sepse, e correlacionar estes achados com o prognóstico destes pacientes. Especificamente, o objetivo de nosso estudo foi:

- Validar a dosagem destes biomarcadores como ferramenta de estratificação de risco em condições mais similares àquelas encontradas na prática clínica.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Pacientes

Foram incluídos neste estudo pacientes com neoplasia hematológica e neutropenia febril (< 500 neutrófilos / μ l e temperatura $\geq 38^{\circ} \text{C}$) admitidos para tratamento quimioterápico ou Transplante de Células Progenitoras Hematopoiéticas (TCPH), de forma ativa, através de visitas diárias (2ª a 6ª feira) às enfermarias de Hematologia e de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da UNICAMP no período de março de 2011 a março de 2012.

3.2 - Definição de Seps 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 seps 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 seps 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 seps foram ainda estratificados no momento da coleta através do cálculo do Índice a Associação Multinacional de Cuidados e Assistência ao Câncer (Mutinational Association for Supportive Care in Cancer –MASCC; Tabela 2) desenvolvido para identificar pacientes neutropênicos febris de baixo

risco, isto é, com alta probabilidade de resolução do quadro febril sem complicações potencialmente fatais (Klastersky J et al., 2000) e de acordo com a gravidade do quadro através do cálculo do escore de avaliação de disfunção orgânica na sepse, o Sequential Organ Failure Assessment (SOFA; Tabela 3), que foi desenvolvido para quantificar as disfunções hepática, renal, pulmonar e cardiovascular e tornar grupos de pacientes distintos comparáveis para o propósito de estudos clínicos (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).

Tabela 2. Escore MASCC (Klastersky et al., 2000)

<i>Características</i>	
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 3. Escore SOFA (Vincent et al., 1996)

Pontos	0	1	2	3	4
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

3.3 - Coleta de dados clínicos e laboratoriais

Os dados clínicos foram obtidos diretamente do prontuário médico, e coletados ao longo da internação (Fig. 8).

Dados clínicos:

- Nome, sexo, data de nascimento, diagnóstico, tipo de tratamento quimioterápico, tipo de transplante, fonte de célula tronco hematopoiética utilizada, presença de co-morbididades clínicas, temperatura máxima dos picos febris, pressão arterial média, necessidade de uso de drogas vasoativas, presença de foco infeccioso clinicamente determinado, evolução clínica da neutropenia (NF não complicada x choque séptico).

Dados laboratoriais

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

Paciente		HC	
Data de nascimento		Sexo	
Esquema de quimioterapia	☐ TMO autólo ☐ TMO alogênico ☐ Qtx altas doses		
Diagnóstico hematológico			
Co-morbidades			
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 °C)			
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 8. Ficha de coleta de dados clínicos e laboratoriais

3.4 - Coleta e preparação das amostras de sangue

As coletas foram feitas por punção venosa periférica ou através de cateter venoso central (nos pacientes com este dispositivo), pela equipe de enfermagem das enfermarias juntamente com a coleta de rotina dos pacientes, na manhã seguinte à assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. As amostras foram então centrifugadas, em centrífuga refrigerada, a 4° C , 1000 x g, por 15 minutos. Todas as amostras foram submetidas ao mesmo processamento. 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). A sensibilidade do kit para dosagem de VEGF foi de 9 pg / ml, e os coeficientes de variação intra-ensaio e interensaio foram de 4,5%-6,7% e de 6,2%-8,8%, respectivamente. A sensibilidade do kit para dosagem de sFlt-1 foi de 3,5 pg / ml e os coeficientes de variação intra-ensaio de 2,6% - 3,8% e de 5,5% -9,8%, respectivamente, 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 (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). A sensibilidade do kit para dosagem de Ang-1 foi de 3,45 pg / ml e os coeficientes de variação intra-ensaio e interensaio foram 2,4%-3,3% e de 5,5%-6,4%, respectivamente. A sensibilidade do kit para dosagem de Ang-2 foi de 8,29 pg/ml e os coeficientes de variação intra-ensaio e interensaio foram 4,2%-6,9% e 7,4%- 10,4%, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante.

3.7- Análise Estatística

A presença ou ausência de choque séptico durante o período de neutropenia foi o desfecho clínico primário usado para estratificação dos pacientes. 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%. Os níveis séricos de angiopoietina foram analisados em um modelo de regressão

logística binária como uma variável contínua e como uma variável dicotômica (em uma análise separada) de forma a avaliar o risco relativo de choque séptico com diferentes níveis de angiopoietina. Os dados foram ajustados para a contagem de neutrófilos e de plaquetas. Uma segunda análise foi realizada para investigar o efeito de concentrações de angiopoietina mortalidade aos 30 dias. As curvas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier. Parâmetros independentemente associados com a sobrevivência foram avaliados através de modelos uni e multivariado de Cox Regression Hazards . Variáveis que tiveram diferença estatística menor que 10% nas análises univariadas foram incluídas no modelo multivariado. Um valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o pacote SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) e o software GraphPad Prism (GraphPad Prism Software Inc. San Diego, Califórnia, EUA).

4- RESULTADOS

4.1 - Características dos pacientes

Durante o período do estudo, um total de 120 pacientes admitidos na enfermaria de hematologia e na unidade de transplante de medula óssea da Unicamp, foram incluídos no estudo. Destes, 99 pacientes preencheram os critérios de inclusão e completaram o protocolo de investigação (Fig. 9). As características destes pacientes são mostradas na Tabela 4.

Dos 99 pacientes, 20 (20,2%) evoluíram com choque séptico. Comorbidades, incluindo Doença Enxerto Contra Hospedeiro Aguda, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, Diabetes, Insuficiência Respiratória Crônica, Insuficiência Cardíaca e Hipertensão Arterial, estavam presentes em 37 pacientes, dos quais 8 evoluíram com choque séptico ($p=0,78$). A contagem de neutrófilos não foi diferente entre os pacientes com neutropenia febril não-complicada ($123,5 \pm 161,5$ neutrófilos) e choque séptico ($81,5 \pm 147,1$ neutrófilos). A identificação do foco foi realizada, através de exames de imagem ($n=16$), e do agente infeccioso ($n=34$), através de hemoculturas e culturas de lesões de pele e seios da face. Pulmão, pele, seios da face e abdômen 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*). Houve diferença no score SOFA entre os dois grupos ($p = <0,05$). Dezesete pacientes com choque séptico foram a óbito por complicações da sepse nos primeiros 28 dias após o início da febre (taxa de mortalidade de todos os pacientes recrutados para o estudo de 17,7 %).

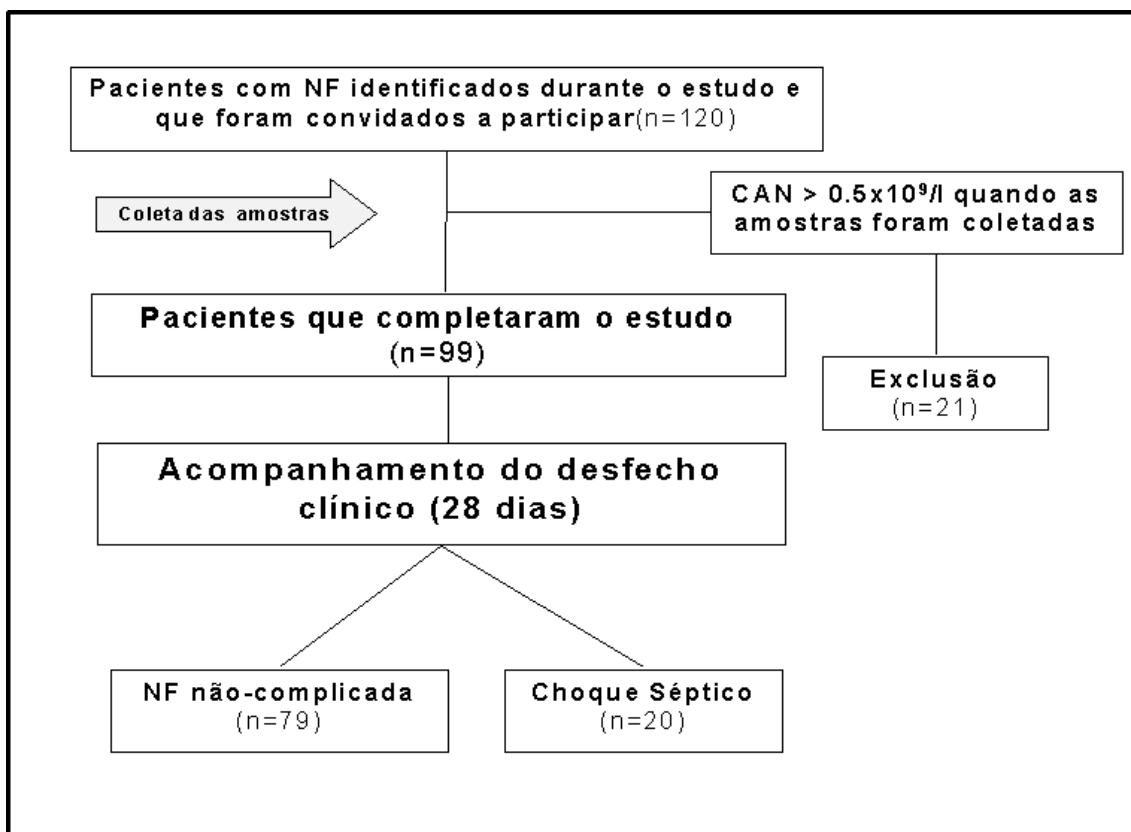


Figura 9. Fluxograma do estudo

CAN: Contagem absoluta de neutrófilos

Tabela 4. Características dos pacientes

Características	NF não-complicada (n=79)	Choque Séptico (n=20)	P
Sexo (Masculino: feminino)	44:35	12:8	NS**
Idade (Mediana, min-máx)	49 (13-78)	49,5 (21-78)	NS**
Diagnóstico			NS**
Leucemia Aguda	30	10	
Outras Patologias [€]	49	10	
Comorbidades (presente:ausente)	29:40	8:12	NS**
Tratamento			NS**
QTx intensiva/TCPH autólogo	62	15	
TCPH alogênico	17	5	
Neutrófilos /mm ³ (mediana,min-máx)	80 (0-500)	0 (0-500)	NS*
Plaquetas /mm ³ (mediana,min-máx)	21000 (4000-315000)	14500 (3000-39000)	NS*
Cultura Positiva (sim:não)	26:53	8:12	NS**
Microorganismo Infectante (Gram- : Gram+)	7:19	6:1	0,002
PCR (mg/dl; mediana, min-máx)	11,20 (0,55-58,3)	12,7 (6,2-40,9)	NS*
SOFA (mediana, min-máx)	4 (0-8)	4 (2-14)	p<0,05*
MASCC (mediana, min-máx)	19 (12-23)	18 (12-21)	NS*
Tempo de Evolução para Choque (Dias)		3 (1-17)	

* Teste de Mann-Whitney; ** Teste de Fisher; €: Linfoma (n=8); Mieloma Múltiplo (n=5), Neoplasia Mieloproliferativa Crônica (n=5); Hemoglobinúria Paroxística Noturna (n=2);

TCPH: transplante de células progenitoras hematopoiéticas; QTx: quimioterapia; NS: não significativo.

4.2 – Avaliação dos níveis séricos de VEGF-A e sFlt-1, Ang-1 e Ang-2 em pacientes com neutropenia febril

4.2.1 - VEGF-A e sFlt-1

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de VEGF-A em pacientes com NF não-complicada (75,23pg / ml, range 26,52-2261 pg / ml) ou com choque séptico (60,05 pg / ml, range 11,25-238,8 pg / ml de Mann-Whitney, $p = 0,15$) (Fig. 10). Os níveis séricos do sFlt-1 também não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com NF não-complicada (83,40 pg / ml, range 30,6-211 pg / ml) ou com choque séptico (88,67 pg / ml, range de 46,05-506,8 pg / ml : teste de Mann-Whitney, $p = 0,29$)(Fig. 11).

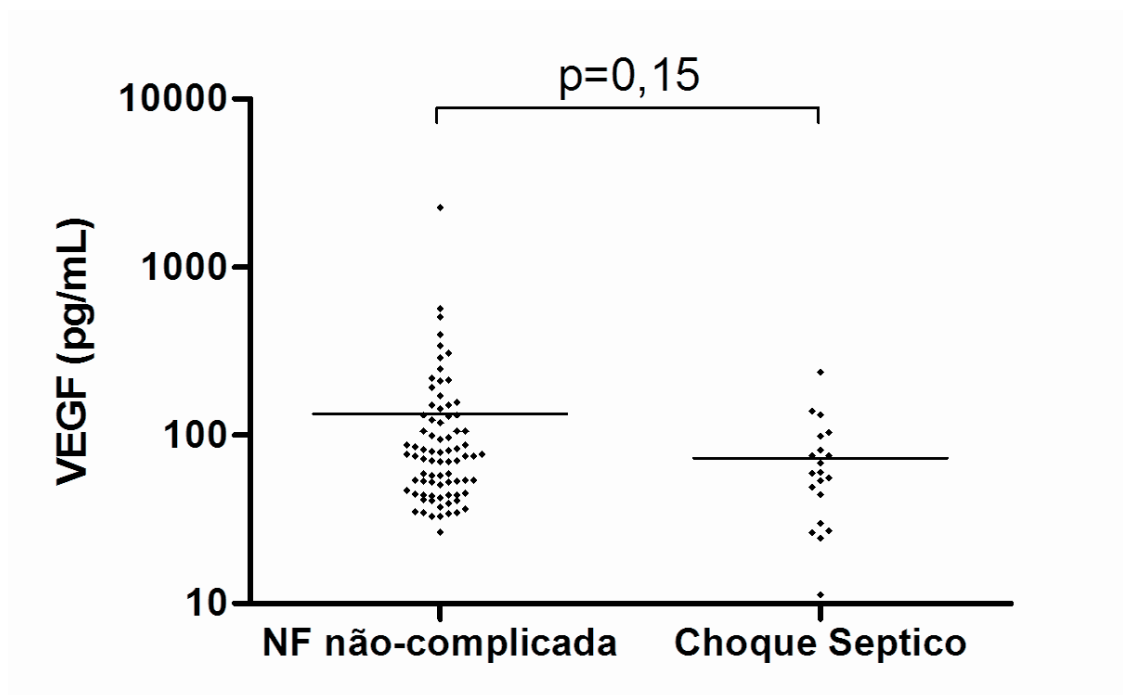


Figura 10. *Scatter plot* representando as concentrações séricas de VEGF-A em pacientes neutropênicos febris sepse não complicada (n=79) e choque séptico (n=20). Teste de Mann-Whitney.

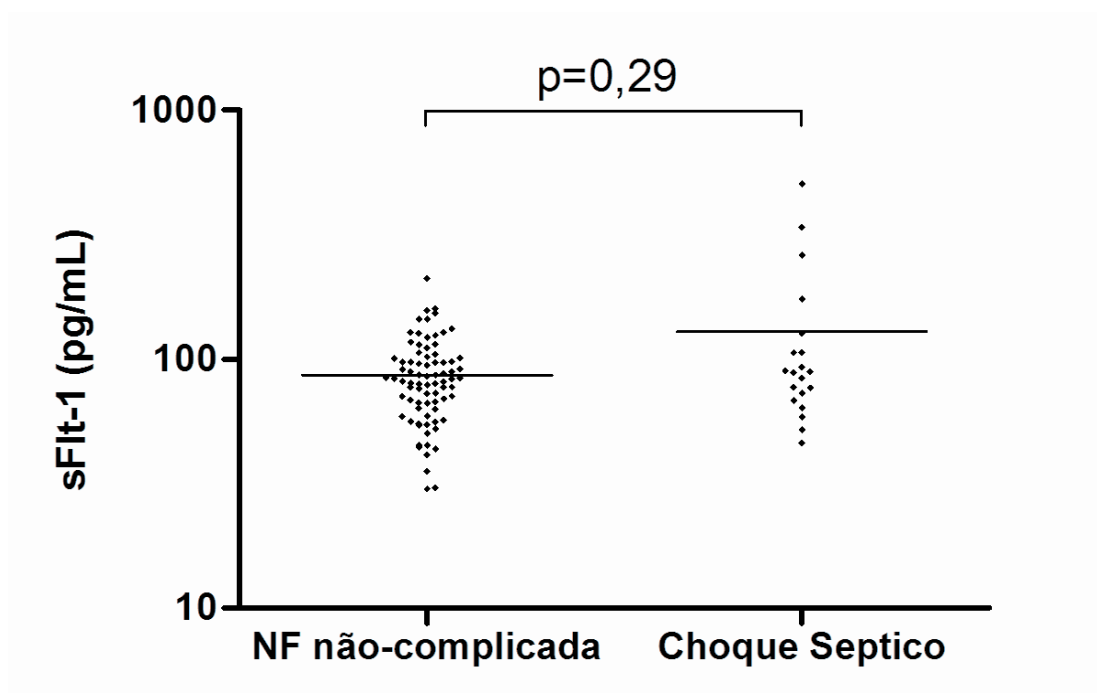


Figura 11. *Scatter plot* representando as concentrações séricas sFlt-1 em pacientes neutropênicos febris sepse não complicada (n=79) e choque séptico (n=20). Teste de Mann-Whitney.

4.2.2 - Angiopoietinas

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de Ang-1 no grupo de pacientes com NF não-complicada (1220 pg / ml, range 32,55-47924 pg / ml) ou com choque séptico (898,8 pg / ml, range 77,87-5420 pg / ml de Mann-Whitney, $p = 0,07$) (Fig. 12). No entanto, uma diferença nos níveis de Ang-2 pode ser observada entre pacientes com NF não complicada e com choque séptico, com uma acentuado aumento nas concentrações de Ang-2 em pacientes com choque séptico (6494 pg / ml, range 1730-49611 pg / ml) quando comparado com pacientes com NF não-complicada (4467 pg / ml, range 1289-37318 pg / ml, teste de Mann-Whitney: $p = 0,02$). (Fig. 13)

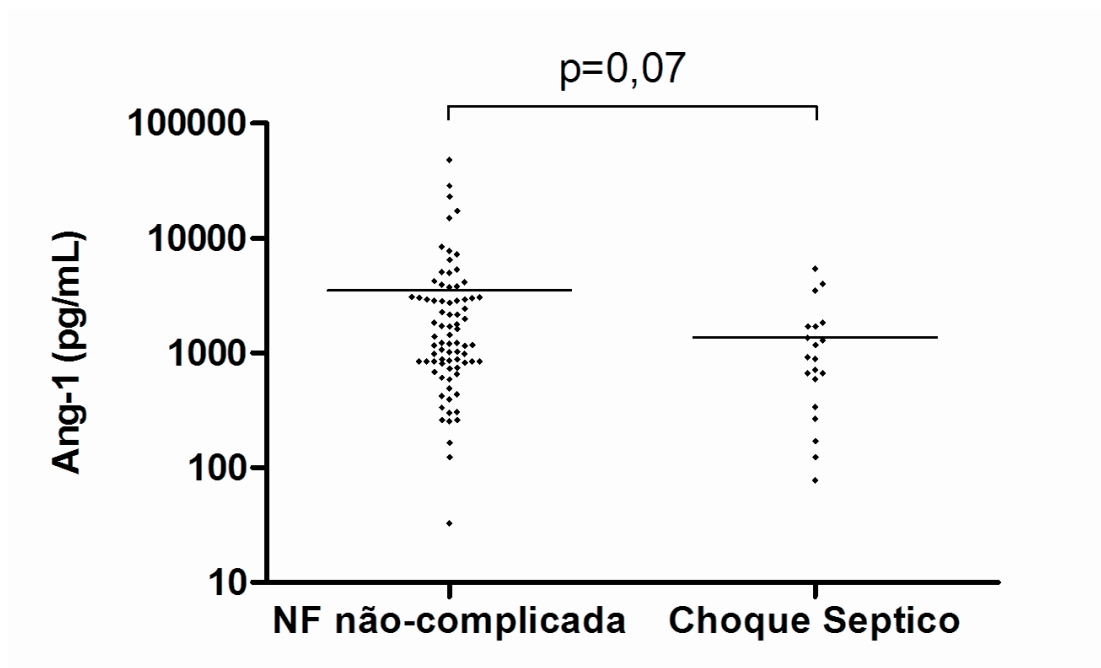


Figura 12. *Scatter plots* representando as concentrações séricas de Ang-1 em pacientes neutropênicos febris não complicada (n=79) e choque séptico (n=20). Teste de Mann-Whitney

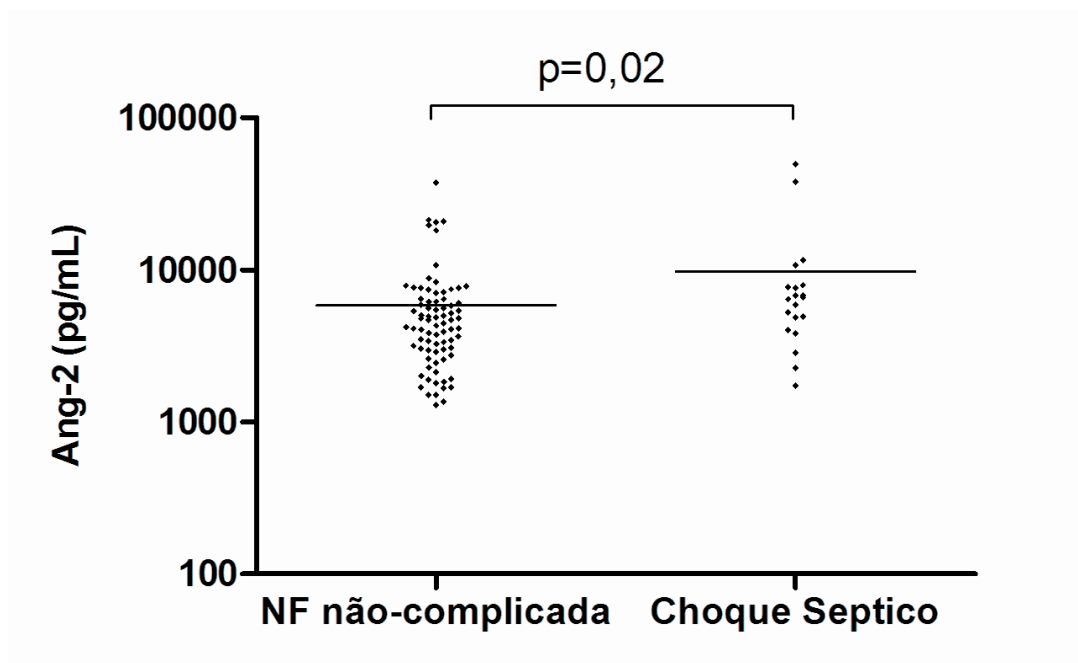


Figura 13. *Scatter plots* representando as concentrações séricas de Ang-2 em pacientes neutropênicos febris não complicada (n=79) e choque séptico (n=20). Teste de Mann-Whitney

A proporção Ang-2/Ang-1 foi calculada em um esforço para detectar alterações relevantes na concentração relativa destes dois antagonistas de mediadores da permeabilidade microvascular. A relação Ang-2/Ang-1 foi significativamente maior em pacientes com choque séptico (5,29, range 0,58-57,14) quando comparado com pacientes com NF não-complicada (1,99, range 0,06-64,62); Mann-Whitney: $p = 0,01$). (Fig. 14)

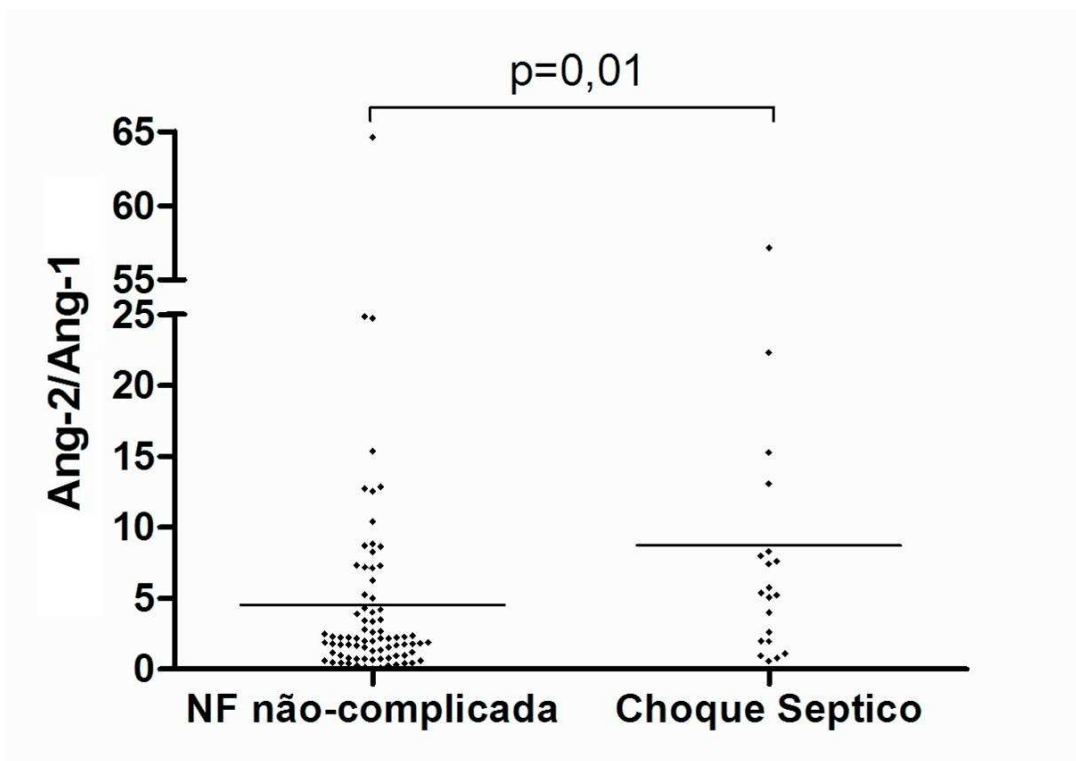


Figura 14. *Scatter plots* representando a relação das concentrações séricas de Ang-2 e Ang-1 em pacientes neutropênicos febris não complicada (n=79) e choque séptico (n=20).
Teste de Mann- Whitney

4.3 - 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, o MASCC e a proteína C reativa (PCR).

4.3.1 - VEGF-A e sFlt-1

Os níveis de VEGF-A não se correlacionaram com nenhum escore de gravidade da sepse. Os níveis de sFlt-1 apresentaram correlação significativa com o SOFA e com a proteína C reativa (Tabela 5).

4.3.2 - Ang-1 e Ang-2

Em relação as angiopoietinas, os níveis de Ang-1 se correlacionaram com o SOFA e os níveis de Ang-2 apresentaram correlação com a proteína C reativa. A relação Ang-2/Ang-1 apresentou correlação significativa com o SOFA (Tabela 5). Não foi observada correlação com o MASCC.

Tabela 5. Correlação dos níveis de VEGF, sFlt-1, Ang-1, Ang-2 e da relação Ang-2/ Ang-1 com a gravidade da sepse

	<i>MASCC</i>	<i>SOFA</i>	<i>PCR</i>
<i>VEGF</i>	Rs = -0,08 p = 0,39	Rs = -0,13 p = 0,17	Rs = 0,04 p = 0,64
<i>sFlt-1</i>	Rs = 0,17 p = 0,09	Rs = 0,24 p=0,01	Rs = 0,26 p = 0,008
<i>Ang-1</i>	Rs = 0,02 p = 0,8	Rs = -0,36 p = 0,0002	Rs = 0,008 p = 0,93
<i>Ang-2</i>	Rs = -0,09 p = 0,33	Rs = 0,02 p = 0,78	Rs = 0,3 p = 0,0024
<i>Ang-2/Ang-1</i>	Rs = -0,14 p = 0,16	Rs = 0,22 p = 0,03	Rs = 0,016 P = 0,86

4.4 - 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. Tanto o VEGF-A como o sFlt-1 apresentaram valores baixos da área sob a curva ROC, de 0,6 (0,46-0,74; $p=0,15$) e 0,57 (0,43-0,72; $p=0,28$), respectivamente, o que sugere que ambos não possuem alto poder de discriminar os pacientes com neutropenia febril que evoluíram com choque séptico na nossa população.

Os valores da área sob a curva ROC dos níveis de Ang-2 e da relação Ang-2/ Ang-1, foram respectivamente, de 0,66 (0,52-0,79; $p=0,02$) e 0,68 (0,55-0,81; $p=0,01$) o que sugere a acurácia diagnóstica destas medidas em discriminar pacientes com neutropenia febril não-complicada e pacientes que evoluíram com choque séptico. (Tabela 6).

Tabela 6. 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	0,60 (0,46-0,74)	0,15
sFlt-1	0,57 (0,43-0,72)	0,28
Ang-1	0,62 (0,49-0,76)	0,07
Ang-2	0,66 (0,52-0,79)	0,02
Relação Ang-2/Ang-1	0,68 (0,55-0,81)	0,01
MASCC	0,59 (0,45-0,74)	0,18
PCR	0,59 (0,46-0,73)	0,19

4.5 - Análises de risco relativo para evolução para choque séptico

Na análise de acurácia diagnóstica da relação Ang-2/Ang-1 a área sob a curva ROC foi de 0,68 (95% CI = 0,5511-0,8122, $p = 0,01$). Na nossa população, o valor da relação Ang-2/Ang-1 de 5,016 foi o melhor *cutt-off* identificado pela curva ROC, prevendo a evolução para choque séptico com uma sensibilidade de 60% (95%IC = 36,05-80,88%) e uma especificidade de 77,22% (95%IC=66,40%-85,90%).

Quando a relação Ang-2/Ang-1 foi analisada como uma variável contínua em um modelo de análise de risco (Cox Hazard proportional), o risco relativo de evolução para choque séptico foi de 1,029 (95%IC=1.001-1,058, $p=0,045$). Ajustando a análise com possíveis fatores de confusão, que em nossa população foram contagem de neutrófilos e contagem de plaquetas, os níveis de Ang-2/Ang-1 permaneceram um fator de risco independente para evolução para choque séptico (risco relativo 1,06; 95%IC=1.019-1,102, $p= 0,004$). Para avaliar se esta relação foi linear ou se houve um nível mínimo da relação Ang-2/Ang-1 que culminou com o aumento do risco relativo para choque séptico, nós dicotomizamos os níveis de Ang-2/Ang-1 em valores acima e abaixo da mediana e do *cutt-off*. O risco relativo associado aos diferentes intervalos de Ang-2/Ang-1 é mostrado na tabela 6. O risco para choque séptico foi quase cinco vezes maior entre os pacientes com níveis de Ang-2/Ang-1 acima do *cutt-off*. A relação entre os níveis de Ang-2/Ang-1 acima do *cutt-off* e o risco para choque séptico permaneceu forte após o ajuste para contagem de neutrófilos e plaquetas (Tabela 7).

Tabela 7. Análise univariada de risco relativo para evolução para choque séptico

Teste do Qui-Quadrado		
Níveis Séricos de	Odds Ratio	P
Ang-2/Ang-1 (n=99)	(95% Intervalo de Confiança)	
<i>>Mediana</i>	2,9 (1 – 8,4)	0,04
<i>>Cutt-off</i>	5,5 (1,9 - 16)	0,0007

Tabela 8. Análise multivariada de risco relativo para evolução para choque séptico

Análise Multivariada		
Níveis Séricos de	Odds Ratio	P
Ang-2/Ang-1 (n=99)	(95% Intervalo de Confiança)	
<i>>Mediana</i>	2,993 (1,022 – 8,419)	0,045
<i>>Cutt-off</i>	5,471 (1,927-15,527)	0,001

4.6 – Sensibilidade e Especificidade da Relação das Angiopoietinas como biomarcador

A sensibilidade e a especificidade são os parâmetros mais comumente utilizados pra avaliar a qualidade de um biomarcador. A sensibilidade descreve quantos pacientes doentes, ou em nosso caso, que evoluíram com choque séptico, tiveram um resultado positivo para o biomarcador (Relação > cuttoff). De uma maneira geral, quanto mais sensível um biomarcador é menor será o numero de pacientes doentes que terão um resultado falso-negativo (Gerlach e Toussaint,

2011). Em nosso trabalho, a sensibilidade da relação das angiopoietinas para detecção do choque séptico foi de 60%, utilizando o cutoff de 5,0. A especificidade utiliza somente os dados de pacientes saudáveis, ou em nosso caso, pacientes que não evoluíram com choque. Uma alta especificidade significa um baixo risco de definir pacientes saudáveis de uma maneira falso-positiva. A especificidade da relação das angiopoietinas em nosso trabalho foi de 77%, utilizando os valores acima. Em nosso estudo o valor preditivo positivo foi de 47% enquanto que o valor preditivo negativo foi de 85%. Os valores preditivos positivo e negativo são parâmetros independentes, porém, o valor preditivo negativo pode ser considerado mais relevante do que o valor preditivo positivo, quando o teste é utilizado como triagem (Gerlach e Toussaint, 2011).

4.7 - Análise da mortalidade por choque séptico em 28 dias

Para determinar a relação entre os níveis de angiopoietina com mortalidade em 28 dias, foi realizada uma curva de sobrevida de Kaplan-Meier. A mortalidade no dia 28 em pacientes com relação Ang-2/Ang-1 menor que o valor do *cutoff* foi de 11% comparado à mortalidade de 52,6% entre os pacientes com relação Ang-2/Ang-1 maior que o *cutoff* ($p=0,0015$ pelo teste de Wilcoxon e pelo teste de log-rank) (Fig.15), resultado semelhante foi encontrado em níveis acima da mediana, onde a mortalidade foi de 33,3% para valores acima da mediana e 10,8% para valores abaixo da mediana ($p = 0,03$ pelo teste de Wilcoxon e pelo teste de log-rank) (Fig.16).

De acordo com a análise univariada, os níveis de Ang-2/Ang-1 acima do *cutt-off* conferiram um risco relativo para óbito de 5,8 (95%IC, 1,965-17,59, $p =$

0,001) e de 2,74 (95%IC, 1,054-7,160, $p = 0,03$) para níveis de Ang-2/Ang-1 acima da mediana. Após ajuste para contagem neutrófilos e de plaquetas, a relação entre os níveis de Ang-2/Ang-1 acima do cutt-off e o risco de mortalidade foi de 4,197 (95%IC, 1,595-11,049, $p = 0,004$) e 2,729 (95%IC, 0,967-7,753, $p = 0,059$) para níveis de Ang-2/Ang-1 acima da mediana (Tabela 9).

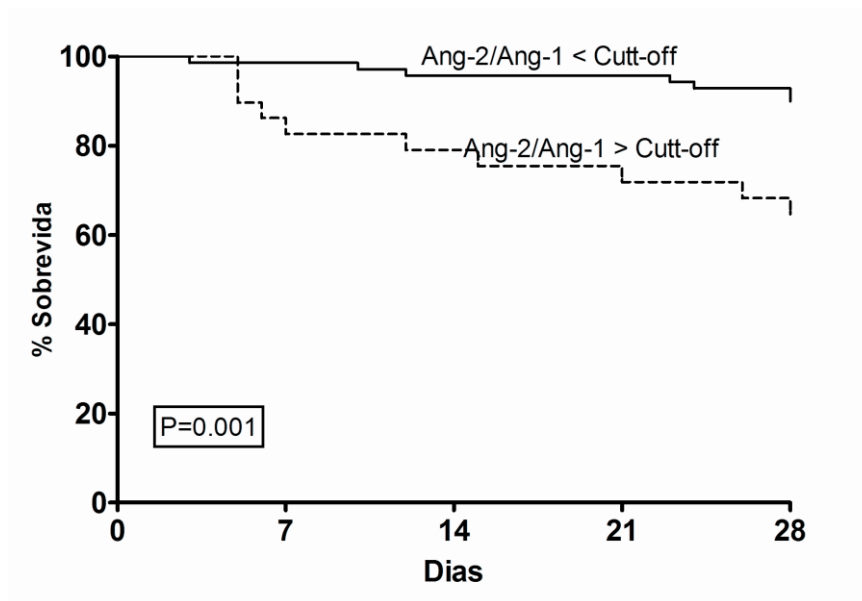


Figura 15. Sobrevida de pacientes com neutropenia febril de acordo com a relação Ang2/Ang-1 estratificada pelo *cutoff*. Curva de Kaplan-Meier ilustrando a sobrevida de pacientes onco-hematológicos neutropênicos febris de acordo com relação Ang-2/Ang-1. Os valores da relação Ang-2/ Ang-1 de cada paciente foram estratificados em relação ao cutt-off da relação Ang-2/Ang-1.

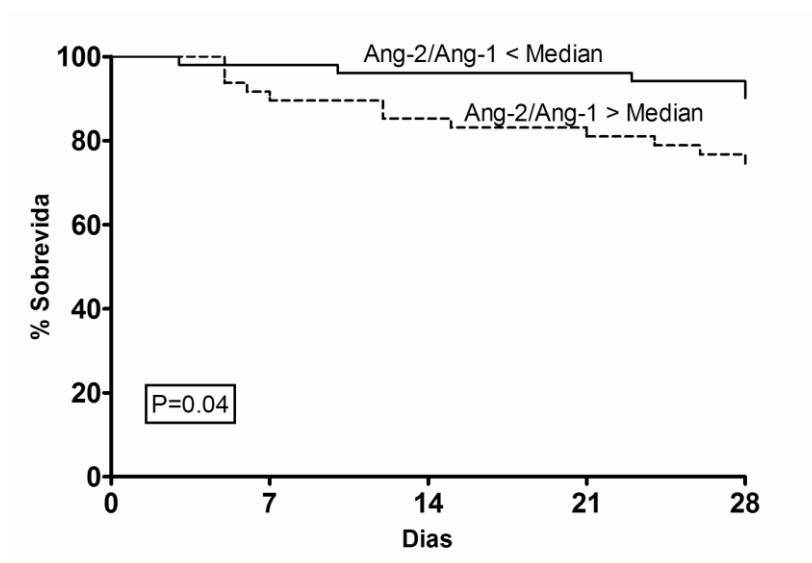


Figura 16. Sobrevida de pacientes com neutropenia febril de acordo com a relação Ang2/Ang-1 estratificada pelo valor da mediana. Curva de Kaplan-Meier ilustrando a sobrevida de pacientes onco-hematológicos neutropênicos febris de acordo com relação Ang-2/Ang-1. Os valores da relação Ang-2/ Ang-1 de cada paciente foram estratificados em relação ao valor da mediana da relação Ang-2/Ang-1.

Tabela 9. Risco Relativo de Óbito de acordo com os níveis séricos de Ang-2/Ang-1

	<i>Risco Relativo Univariada (95% IC)</i>	<i>Risco Relativo Multivariada (95% IC)</i>
>Mediana	2,74 (1,05-7,16)*	2,73 (0,97-7,75)
>Cutt-off	5,80 (1,96-17,59)*	4,20 (1,59-11,05)*

* p<0,05

5- DISCUSSÃO

Em nosso estudo, o uso da relação Ang-2/Ang-1, um importante indicador de desbalanço entre dois moduladores da permeabilidade endotelial, foi validado como biomarcador relevante para o desenvolvimento de choque séptico em pacientes com câncer e neutropenia febril de alto risco. As implicações destes resultados serão discutidas sob uma ótica mais geral, do papel destes biomarcadores na sepse, e sob uma ótica mais específica, relacionada a sua importância no manejo de pacientes com neutropenia febril.

5.1 – Aspectos gerais do uso de moduladores da permeabilidade endotelial como biomarcadores na sepse

Nos últimos anos, grandes avanços foram alcançados na compreensão dos mecanismos celulares e moleculares que regulam a estabilidade da barreira endotelial. Grande parte deste conhecimento deriva de estudos sobre os mecanismos de angiogênese no embrião, que como destacamos anteriormente, exige a quebra constante e finamente regulada da ligação entre células endoteliais. A compreensão dos mecanismos de angiogênese foi impulsionada desde o início dos anos 1970, quando Judah Folkman e colaboradores, observaram que o crescimento tumoral era fortemente dependente da formação de novos vasos, e postularam que a inibição deste processo poderia ser usada como terapia anti-tumoral (Folkman et al., 1971). Iniciou-se então uma busca pelos fatores que regulariam este processo, que levou à identificação do VEGF por dois grupos no ano de 1989 (Keck et al., 1989; Leung et al., 1989). Curiosamente, embora o VEGF tenha sido assim batizado por estas duas publicações, a proteína

identificada por estes autores já havia sido descrita em 1983 como um potente fator de permeabilidade vascular, secretado por células tumorais, à época chamado de “*Vascular Permeability Factor*” (Senger et al., 1983). Na medida em que o interesse por esta proteína focou-se em seu papel mitogênico sobre células endoteliais – estimulado pelas possibilidades de seu uso terapêutico na terapia do câncer (drogas anti-VEGF) ou da isquemia (a chamada “angiogênese terapêutica”), pouca atenção foi dada a sua função de quebra de barreira endotelial. No entanto, é possível encontrar evidências do efeito permeabilizante do VEGF se analisarmos retrospectivamente os eventos adversos nos estudos iniciais de uso de VEGF em pacientes com isquemia miocárdica, os quais apresentavam edema de membros inferiores como um dos poucos efeitos colaterais do tratamento (Losordo et al., 2002).

De forma resumida, o processo de angiogênese no embrião, cuja compreensão levou ao melhor entendimento de como a barreira endotelial é regulada, envolve a desestabilização e estabilização sequencial da linha endotelial, para a incorporação de novos brotos vasculares (Conway et al., 2001). Como já descrito, as angiopoietinas 1 e 2 participam ativamente deste processo, com as funções antagônicas de estabilização e desestabilização da integridade da barreira endotelial respectivamente. Por sua vez, o sFlt-1 funciona como um antagonista natural do VEGF, por se tratar da forma solúvel do receptor de VEGF, VEGFR-1, atuando como receptor “armadilha”. Estas quatro proteínas exercem funções críticas durante o processo de angiogênese, ilustrado pela letalidade embrionária da deleção gênica destas vias (Dumont et al., 1994; Shalaby et al., 1995; Suri et al., 1996).

Apesar de seu evidente efeito sobre a integridade da barreira endotelial, foi apenas a partir de 2005, que a possibilidade de participação do VEGF como mediador do aumento da permeabilidade endotelial foi postulada, a partir de um estudo em pacientes com choque séptico, que apresentavam níveis mais elevados desta proteína do que indivíduos normais (van der Flier et al., 2005). Logo em seguida, um estudo abrangente utilizando modelos animais de sepse e soro de pacientes confirmou a participação do VEGF na fisiopatologia da sepse, além de mostrar que o uso do sFlt-1, seu inibidor natural, revertia os efeitos da sepse experimental murina (Yano et al., 2006). A partir daí, vários estudos passaram a avaliar a associação entre o VEGF e outras proteínas como a Ang-1 e a Ang-2 com a sepse grave e o choque séptico. De uma maneira geral, estes estudos chegavam ao mesmo padrão de resultados caracterizados por aumento dos níveis de moduladores associados a quebra da barreira endotelial como o VEGF-A e a Ang-2, e redução das concentrações de moduladores associados a estabilização da barreira, como a Ang-1. Poucos estudos avaliaram o sFlt-1, com resultados conflitantes entre si (Carrol, 2011; Kumpers et al., 2008; Pickkers et al., 2005; Ricciuto et al., 2011; van der Flier et al., 2005).

A pesquisa de biomarcadores é um dos campos mais dinâmicos de investigação da medicina. No contexto da sepse, a disponibilidade de biomarcadores apresenta duas aplicações mais óbvias: (i) a identificação de pacientes com infecção em meio a pacientes com SRIS por outros motivos, e (ii) a identificação de pacientes mais graves, ou com maior potencial de complicações (Marshall e Reinhart, 2009; Paulus et al., 2011; Pierrakos e Vincent; 2010). Além destas duas aplicações, um benefício potencial de biomarcadores que

gostaríamos de destacar seria a identificação de subgrupos de pacientes com maior risco de complicações específicas, como por exemplo insuficiência renal, trombooses, entre outras. A identificação destes subgrupos poderia ter implicações terapêuticas se medidas preventivas eficazes pudessem ser implementadas. De fato, à medida que a compreensão sobre cada elemento da fisiopatologia da sepse é melhor entendido, torna-se clara a heterogeneidade desta síndrome, sendo possível imaginar que no futuro possamos identificar subgrupos de pacientes em que mecanismos fisiopatológicos distintos sejam mais ou menos importantes. Esta possibilidade abre uma nova janela para o uso de biomarcadores, pois estes subgrupos hipotéticos de pacientes poderiam responder de forma distinta a tratamentos alvo-específicos na sepse. Na verdade, esta possibilidade já foi aventada na prática por autores que argumentaram que a proteína C ativada poderia ter melhores resultados se indicada para pacientes em que a ativação da coagulação (CIVD) fosse mais evidente (Dhainaut et al., 2004). No entanto, a indisponibilidade de biomarcadores adequados para a definição da chamada “ativação da coagulação”, na medida em que os escores de CIVD tendem a identificar um grupo muito heterogêneo de pacientes, pode ter limitado o sucesso desta tentativa. Analogamente, a disponibilidade de um biomarcador capaz de identificar precocemente a ativação de vias associadas à quebra da barreira endotelial poderia ser muito importante para o sucesso de tratamentos alvo-específicos, voltados para a modulação da integridade da barreira endotelial na sepse. Esta aplicação - ainda teórica - torna-se bastante atrativa na medida em que a modulação da integridade da barreira endotelial vem surgindo como um importante alvo para o desenvolvimento de novas terapias para a sepse

(Goldenberg et al., 2011). De fato, vários estudos em modelos animais estão explorando o papel do bloqueio das vias do VEGF e das angiopoietinas na sepse (Alfieri et al., 2012; Kumpers et al., 2011; London et al., 2010; Yano et al., 2006). O potencial destas estratégias foi recentemente reforçado por um estudo mostrando que camundongos heterozigotos para a deficiência de Ang-2 apresentavam menor disfunção orgânica e maior estabilidade das junções intercelulares na sepse experimental murina (David et al., 2012).

5.2 – A importância dos estudos de validação de biomarcadores da sepse

O número de biomarcadores da sepse avaliados em estudos que demonstram seu potencial de aplicação clínica é muitas vezes maior que o número de biomarcadores efetivamente incorporados à prática clínica. Uma explicação potencial para esta discrepância é a negligência dada aos passos de validação destes biomarcadores em populações independentes e em condições experimentais mais próximas à “vida real”. Assim, é possível imaginar que muitos dos resultados “promissores” obtidos em estudos iniciais não sejam confirmados em estudos subsequentes, explicando a interrupção deste processo antes da incorporação à clínica. Esta importante questão foi elegantemente discutida em um artigo intitulado “*A arquitetura da pesquisa diagnóstica*” (Sackett e Haynes, 2002), que destaca que o excesso de controle experimental nos estudos iniciais de biomarcadores, como por exemplo o uso de populações homogêneas, a coleta e processamento pelo mesmo indivíduo, entre outros, limita a universalização dos resultados, exigindo estudos de validação.

É a partir destas premissas que decidimos validar em uma população independente, resultados que já havíamos obtido em uma população menor, e sob condições mais controladas, sobre o papel do VEGF-A, sFlt-1, e das Ang-1 e Ang-2 na sepse. Neste estudo inicial, havíamos avaliado os níveis séricos de VEGF-A, sFlt-1, Ang-1 e Ang-2 em 41 pacientes com NF, dos quais oito evoluíram com choque séptico. Como o objetivo do estudo era explorar pela primeira vez se estes marcadores estavam associados ao choque séptico em NF (apenas o VEGF-A já havia sido estudado nesta população) (Hamalainen et al., 2009), muitas variáveis foram controladas, a fim de se obter um quadro mais preciso desta potencial associação: em primeiro lugar, apenas pacientes que permaneciam internados durante toda a quimioterapia foram inseridos no estudo, o que permitia a coleta da primeira amostra poucas horas depois do primeiro pico febril. Por outro lado, isto limitava a representatividade da população, além de criar uma situação improvável na prática clínica no que diz respeito ao momento da coleta. Em segundo lugar, os pacientes foram submetidos a coletas seriadas após 48 e 72 horas da febre. Isto permitiu demonstrar que, embora o tempo prolongado desde a febre aumentasse a sensibilidade do biomarcador, algumas diferenças já estavam presentes no momento da febre. Finalmente, a coleta e o processamento foi feito pelo mesmo pesquisador, o que limitava a variabilidade pré-analítica a níveis não encontrados na prática clínica, limitando pois o potencial de universalização de nossos resultados. Deste modo, diante de resultados que consideramos à época promissores, caracterizados por aumento dos níveis de VEGF-A e Ang-2 e redução dos níveis de Ang-1 nos pacientes que desenvolviam choque séptico, entendemos que seria interessante “desafiar” este painel de biomarcadores com

uma situação mais próxima da realidade clínica na qual eles seriam testados. Nossa hipótese era que, embora alguns dos resultados pudessem não ser reproduzidos no novo estudo, seria possível que o uso conjunto destes biomarcadores pudesse gerar informações mais robustas sobre o risco de desenvolvimento de choque séptico, permitindo talvez o estabelecimento de um escore baseado em moduladores de quebra da barreira endotelial.

Como o objetivo deste segundo estudo não era mais explorar aspectos biológicos da associação destes marcadores com a sepse, eliminamos as coletas seriadas, e estabelecemos um protocolo mais próximo da forma como um biomarcador seria de fato utilizado, já descrito neste manuscrito. Dentre todas as características deste desenho, destacamos o fato de que todos os pacientes internados por NF em nossa instituição no período do estudo foram convidados a participar, com raras exceções de pacientes que possam ter sido internados em outras enfermarias sem conhecimento de nosso grupo. Pela estratégia de busca, estimamos que isso possa ter ocorrido em frequência extremamente baixa. Quanto aos pacientes internados no final de semana, o recrutamento era feito na segunda-feira, e a coleta na manhã seguinte. Destacamos que este *timing* de coleta, ao qual uma minoria dos pacientes foi submetido, reproduz o momento de coleta da PCR em nossas enfermarias, já que a mesma é solicitada durante a semana pela equipe da hematologia. Enfim, nosso objetivo foi reproduzir fielmente a prática clínica durante a realização do estudo. Finalmente, é importante destacar que uma pequena parcela de pacientes com NF pós quimioterapia que dá entrada em nosso serviço é encaminhada a hospitais secundários para tratamento com antibioticoterapia oral. Estes pacientes são aqueles de baixo risco pelo escore

MASCC, e embora não quantificados no período deste estudo, devem representar menos de 25% dos pacientes com neoplasias hematológicas e NF (estimativa arbitrária dos autores). Assim, nossa amostra apresenta um viés de seleção em relação a pacientes com NF de alto risco. Tal fato, reconhecido por nós no título do manuscrito científico, limita nossas conclusões a este grupo. No entanto, esta limitação pode ser vista também como um aspecto interessante do estudo, já que nos permitiu constituir uma amostra em que cerca de três quartos dos pacientes são de alto-risco, que como veremos a seguir, são justamente aqueles para os quais os escores de estratificação de risco não geram informações relevantes, e para os quais o manejo da NF é mais desafiador.

5.3 – A relação Ang-2/Ang-1 como biomarcador do desenvolvimento de choque séptico em pacientes com neutropenia febril

Pacientes com câncer são geralmente excluídos ou sub-representados em estudos que buscam novos biomarcadores na sepse, a despeito do fato do câncer e seu tratamento estarem entre os fatores de risco mais relevantes para complicações da sepse. Entre os pacientes com câncer, aqueles com neoplasias hematológicas apresentam um risco de base ainda maior para evolução para choque séptico, principalmente devido ao período intenso e, geralmente, de longa duração da neutropenia grave, requerido em contextos tais como a terapia de indução para leucemias agudas e transplante de células-tronco hematopoiéticas (Legrand et al., 2012) . A ferramenta de estratificação de risco para sepse mais aceita para pacientes oncológicos e com NF é o escore MASCC (Associação

Multinacional de Cuidados de Suporte em Câncer) (Klastersky et al., 2000). O MASCC pode identificar com precisão pacientes com NF de baixo risco, que são principalmente pacientes ambulatoriais, com neutropenia de curta duração (em geral 1-3 dias), mas oferece informações limitadas para pacientes de alto risco (MASCC <21), onde se encaixam a maioria dos pacientes submetidos a protocolos de quimioterapia intensiva, como os pacientes com neoplasias hematológicas e outras neoplasias em pacientes mais jovens (que toleram esquemas mais agressivos, usados com intenção curativa). Esta limitação foi recentemente reconhecida pelos próprios autores do escore MASCC (Klastersky et al., 2011). Como resultado, todos os pacientes com NF de alto risco acabam tratados de maneira empírica e agressiva, com hospitalização e uso de antibióticos de amplo espectro por vários dias.

Um achado relevante de nosso estudo foi o fato de as dosagens de VEGF-A e de sFlt-1 não terem se associado a diferenças no prognóstico em nossa população. Especialmente no caso do VEGF-A, este resultado é discordante em relação a estudos anteriores realizados em pacientes não-neutropênicos e neutropênicos, incluindo nosso estudo preliminar (Alves et al., 2011; Hamalainen et al., 2009). Vários fatores podem explicar esta discrepância, e embora o desenho de nosso estudo não tenha como objetivo nem capacidade de elucidá-los, iremos discuti-los a seguir. Entre estes fatores podemos citar: (i) o momento da coleta, mais tardio em relação ao momento da febre do que em nosso estudo inicial; (ii) o fato de que algumas neoplasias apresentam variações basais nos níveis de VEGF e sFlt-1, o que pode limitar o uso destes fatores como biomarcadores (Guo et al., 2012); e (iii) o fato de que grande parte do VEGF-A é

expresso por neutrófilos e plaquetas, o que também pode limitar seu uso como biomarcador na NF (Kusumanto et al., 2003). Qualquer que seja a causa, o que nosso estudo pode sim concluir é que a dosagem destas proteínas não apresenta a robustez necessária para seu uso na prática clínica. Em outras palavras, em nosso entendimento o resultado discrepante não sugere que haja problemas com um dos estudos, mas sim reforça a importância de desenhos mais “desafiadores” antes da conclusão pela utilidade de um biomarcador.

Por outro lado, pudemos confirmar que o aumento da Ang-2 e a redução da Ang-1, melhor expressa pelo aumento da razão Ang-2/Ang-1, pode ser usado como um biomarcador para o desenvolvimento de choque séptico em pacientes com NF de alto risco. A persistência da significância estatística apesar do desenho de nosso estudo mostra a consistência desta associação, sugerida por vários estudos em outras populações, e pelo grande número de estudos em modelos animais mostrando o potencial terapêutico da manipulação desta via no manejo do choque séptico.

Além de validar nossos resultados, um dos principais objetivos de nosso estudo era avaliar se os resultados promissores do uso da razão Ang-2/Ang-1 observado em pacientes sem neutropenia também seria aplicado a esta população. Além de confirmarmos esta hipótese, vale destacar que o valor estimado do *cut-off* para separação entre os dois grupos em nosso estudo (5 unidades) foi exatamente o mesmo encontrado em um grande estudo em pacientes não neutropênicos, no qual a média do pico da razão Ang-2/Ang-1 foi precisamente 5,4. Em comparação com pacientes não-neutropênicos incluídos em

estudos semelhantes em UTIs, nossos pacientes apresentam menos sinais de disfunção orgânica no momento da coleta, como evidenciado pelo escore SOFA (mediana de 4). Isto pode ser explicado pelo fato de que pacientes com NF procuram atendimento médico precocemente, logo após o primeiro pico febril (por orientação médica), o que permite sua inclusão nestes estudos em momentos mais precoces da história natural da sepse. Desta forma, a semelhança nos valores críticos da relação Ang-2/Ang-1 em duas populações tão distintas pode ser vista como mais uma evidência da associação entre este parâmetro e o grau de ativação de vias críticas para a regulação da integridade da barreira endotelial no choque séptico (Ricciuto et al., 2011).

Nosso estudo apresenta limitações importantes que devem ser destacadas. Em primeiro lugar, a não inclusão de outros centros pode limitar a universalização de nossos resultados. O fato de a inserção ter sido feita em duas unidades independentes de nosso hospital minimiza mas não elimina este problema. Na fase de construção do projeto, aventamos a possibilidade de colaboração com outros centros, mas por motivos que fugiram do controle de todas as partes envolvidas, isso não foi possível. Este fato destaca a importância da participação em grupos colaborativos para a geração de dados com maior impacto. Outra limitação à aplicação destes resultados é o fato de os testes terem sido realizados com ensaios para uso em pesquisa. Assim, caso a dosagem deste biomarcador venha um dia a ser incorporada à prática clínica, novos estudos de validação deverão ser feitos com quaisquer plataformas diagnósticas que forem propostas para este teste. No entanto, este não era o objetivo de nosso estudo.

Em relação aos resultados propriamente ditos, algumas limitações devem ser destacadas. Apesar da significância estatística e da capacidade preditora mantida na análise multivariada, os valores de sensibilidade, especificidade e de valor preditivo positivo e negativo podem ser vistos como aquém do desejado para um biomarcador “perfeito” na sepse. Se por um lado a acurácia diagnóstica da razão Ang-2/Ang-1, estimada pela curva ROC, não é tão alta quanto seria desejada, ela foi superior ao MASCC e à PCR obtidos no mesmo momento da coleta. Além disso, ainda que a determinação desta razão não tenha o potencial de ser usado isoladamente como biomarcador nestes pacientes, é possível que ela possa ser incorporada a escores com outros biomarcadores, ou ainda, ser usada para a identificação de subgrupos de pacientes em que, no futuro, terapias alvo-específicas voltadas para a disfunção da barreira endotelial, sejam mais eficazes. Em se tratando de uma população tão heterogênea como a de pacientes com sepse, é razoável supor que a disponibilidade de um biomarcador capaz de identificar subgrupos específicos de pacientes pode ser a diferença entre a falha e o sucesso de um tratamento alvo-específico no futuro, a exemplo do que já foi discutido para a proteína C ativada em pacientes com ativação da coagulação. Finalmente, na medida em que nosso estudo foi desenhado para reproduzir a prática clínica, evitando critérios de exclusão desnecessários, devemos destacar para os 3 pacientes do grupo de choque séptico que já apresentavam esta condição no momento da coleta. No entanto, a análise estatística foi repetida com a exclusão destes 3 pacientes, sem perda da significância estatística nas dosagens de Ang-2 e da razão Ang-2/Ang-1 entre os grupos.

6- CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos propostos pudemos concluir que:

- O impacto prognóstico da relação Ang-2/Ang-1 na estratificação de risco para choque séptico foi validado no contexto da neutropenia febril de alto risco.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham E, Reinhart K, Opal S, Demeyer I, Doig C, Rodriguez AL, et al. Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003; 290 (2): 238-47.

Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H, et al. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. *Jama* 1995; 273 (12): 934-41.

Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8 (6): 464-78.

Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406 (6797): 782-7.

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

Alfieri A, Watson JJ, Kammerer RA, Tasab M, Progas P, Reeves K, et al. Angiopoietin-1 variant reduces LPS-induced microvascular dysfunction in a murine model of sepsis. *Crit Care* 2012; 16 (5): R182.

Alves BE, Montalvao SA, Aranha FJ, Lorand-Metze I, De Souza CA, Annichino-Bizzacchi JM, et al. Time-course of sFlt-1 and VEGF-A release in neutropenic patients with sepsis and septic shock: a prospective study. *J Transl Med* 2011; 9: 23.

Alves BE, Montalvao SA, Aranha FJ, Siegl TF, Souza CA, Lorand-Metze I, et al. 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.

Andre S, Taboulet P, Elie C, Milpied N, Nahon M, Kierzek G, et al. Febrile neutropenia in French emergency departments: results of a prospective multicentre survey. *Crit Care* 2010; 14 (2): R68.

Angelini DJ, Hyun SW, Grigoryev DN, Garg P, Gong P, Singh IS, et al. TNF-alpha increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291 (6): L1232-45.

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.

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.

Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 2004; 84 (3): 869-901.

Biomarkers Definitions Working Group B. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69 (3): 89-95.

Bodey G, Abi-Said D, Rolston K, Raad I, Whimbey E. Imipenem or cefoperazone-sulbactam combined with vancomycin for therapy of presumed or proven infection in neutropenic cancer patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15 (8): 625-34.

Bone RC. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *Jama* 1992; 268 (24): 3452-5.

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.

Carrol ED. Angiopoietins as prognostic biomarkers and effector molecules in severe sepsis. *Crit Care Med* 2011; 39 (9): 2203-4; author reply 04.

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

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

Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, et al. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96 (17): 9815-20.

David S, Mukherjee A, Ghosh CC, Yano M, Khankin EV, Wenger JB, et al. Angiopoietin-2 may contribute to multiple organ dysfunction and death in sepsis*. Crit Care Med 2012; 40 (11): 3034-41.

Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. J Cell Sci 2008; 121 (Pt 13): 2115-22.

Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein BM. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. Dev Cell 2009; 16 (2): 209-21.

Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. Crit Care Med 2008; 36 (1): 296-327.

Dhainaut JF, Yan SB, Joyce DE, Pettila V, Basson B, Brandt JT, et al. Treatment effects of drotrecogin alfa (activated) in patients with severe sepsis with or without overt disseminated intravascular coagulation. J Thromb Haemost 2004; 2 (11): 1924-33.

Djonov V, Schmid M, Tschanz SA, Burri PH. Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. Circ Res 2000; 86 (3): 286-92.

Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri MC, Gertsenstein M, Auerbach A, et al. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. Genes Dev 1994; 8 (16): 1897-909.

Eichacker PQ, Natanson C, Danner RL. Surviving sepsis--practice guidelines, marketing campaigns, and Eli Lilly. N Engl J Med 2006; 355 (16): 1640-2.

Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. J Cell Sci 1998; 111 (Pt 13): 1853-65.

Fagiani E, Christofori G. Angiopoietins in angiogenesis. Cancer Lett 2013; 328 (1): 18-26.

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

Ferrer R, Artigas A, Levy MM, Blanco J, Gonzalez-Diaz G, Garnacho-Montero J, et al. Improvement in process of care and outcome after a multicenter severe sepsis educational program in Spain. *Jama* 2008; 299 (19): 2294-303.

Fiusa MML, Annichino-Bizzacchi JM, De Paula EV. Vascular Wall-Related Biomarkers in Sepsis: A Review of Current Evidence and a Critical Appraisal of Recent Patents Bentham Science Publishers 2012; 2 (2): 113-18.

Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971; 133 (2): 275-88.

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.

Gerlach H, Toussaint S. Sensitive, specific, predictive... statistical basics: how to use biomarkers. *Crit Care Clin* 2011; 27 (2): 215-27.

Geroulanos S, Douka ET. Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive Care Med* 2006; 32 (12): 2077.

Goldenberg NM, Steinberg BE, Slutsky AS, Lee WL. Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis. *Sci Transl Med* 2011; 3 (88): 88ps25.

Gonzalez-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778 (3): 729-56.

Guo B, Liu Y, Tan X, Cen H. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in adult patients with acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leuk Lymphoma* 2012:

Hamalainen S, Juutilainen A, Matinlahti 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.

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.

Jimenez MF, Marshall JC. Source control in the management of sepsis. *Intensive Care Med* 2001; 27 Suppl 1: S49-62.

Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989; 246 (4935): 1309-12.

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.

Klastersky J, Awada A, Paesmans M, Aoun M. Febrile neutropenia: a critical review of the initial management. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011; 78 (3): 185-94.

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.

Kumpers P, Gueler F, David S, Slyke PV, Dumont DJ, Park JK, et al. The synthetic tie2 agonist peptide vasculotide protects against vascular leakage and reduces mortality in murine abdominal sepsis. *Crit Care* 2011; 15 (5): R261.

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.

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.

Legrand M, Max A, Peigne V, Mariotte E, Canet E, Debrumetz A, et al. Survival in neutropenic patients with severe sepsis or septic shock. *Crit Care Med* 2012; 40 (1): 43-9.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246 (4935): 1306-9.

Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, Linde-Zwirble WT, Marshall JC, Bion J, et al. The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Crit Care Med* 2010; 38 (2): 367-74.

London NR, Zhu W, Bozza FA, Smith MC, Greif DM, Sorensen LK, et al. Targeting Robo4-dependent Slit signaling to survive the cytokine storm in sepsis and influenza. *Sci Transl Med* 2010; 2 (23): 23ra19.

Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, Milliken CE, Fortuin FD, Cummings N, et al. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2002; 105 (17): 2012-8.

Marshall JC, Dellinger RP, Levy M. The Surviving Sepsis Campaign: a history and a perspective. *Surg Infect (Larchmt)* 2010; 11 (3): 275-81.

Marshall JC, Maier RV, Jimenez M, Dellinger EP. Source control in the management of severe sepsis and septic shock: an evidence-based review. *Crit Care Med* 2004; 32 (11 Suppl): S513-26.

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

Matter K, Balda MS. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4 (3): 225-36.

McMillan DC. Systemic inflammation, nutritional status and survival in patients with cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009; 12 (3): 223-6.

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

Namas R, Zamora R, Namas R, An G, Doyle J, Dick TE, et al. Sepsis: Something old, something new, and a systems view. *J Crit Care* 2012; 27 (3): 314 e1-11.

Neumann F, Lobitz O, Fenk R, Bruns I, Kostering 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.

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

Opal SM. Phylogenetic and functional relationships between coagulation and the innate immune response. *Crit Care Med* 2000; 28 (9 Suppl): S77-80.

Patel-Hett S, D'Amore PA. Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *Int J Dev Biol* 2011; 55 (4-5): 353-63.

Paulus P, Jennewein C, Zacharowski K. Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomarkers* 2011; 16 Suppl 1: S11-21.

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.

Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care* 14 (1): R15.

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

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.

Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut JF, Douglas IS, Finfer S, et al. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med* 2012; 366 (22): 2055-64.

Ricciuto DR, dos Santos CC, Hawkes M, Toltl LJ, Conroy AL, Rajwans N, et al. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 as clinically informative prognostic biomarkers of morbidity and mortality in severe sepsis. *Crit Care Med* 2011; 39 (4): 702-10.

Risau W, Lemmon V. Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis. *Dev Biol* 1988; 125 (2): 441-50.

Sackett DL, Haynes RB. The architecture of diagnostic research. *Bmj* 2002; 324 (7336): 539-41.

Saharinen P, Bry M, Alitalo K. How do angiopoietins Tie in with vascular endothelial growth factors? *Curr Opin Hematol* 2010; 17 (3): 198-205.

Saharinen P, Eklund L, Pulkki K, Bono P, Alitalo K. VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis. *Trends Mol Med* 2011; 17 (7): 347-62.

Salomao R, Brunialti MK, Rapozo MM, Baggio-Zappia GL, Galanos C, Freudenberg M. Bacterial sensing, cell signaling, and modulation of the immune response during sepsis. *Shock* 2012; 38 (3): 227-42.

Schottmueller H. Wesen und Behandlung der sepsis. *Inn Med* 1914; 31: 257-80.

Seeley EJ, Matthay MA, Wolters PJ. Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 303 (5): L355-63.

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.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376 (6535): 62-6.

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.

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

Sudhoff T, Giagounidis A, Karthaus M. Serum and plasma parameters in clinical evaluation of neutropenic fever. *Antibiot Chemother* 2000; 50: 10-9.

Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonnier PC, Davis S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; 87 (7): 1171-80.

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

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.

Tidswell M, Tillis W, Larosa SP, Lynn M, Wittek AE, Kao R, et al. Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2010; 38 (1): 72-83.

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.

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.

Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I, et al. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *Jama* 2001; 286 (15): 1869-78.

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.

Xiao K, Garner J, Buckley KM, Vincent PA, Chiasson CM, Dejana E, et al. p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Mol Biol Cell* 2005; 16 (11): 5141-51.

Xing K, Murthy S, Liles WC, Singh JM. Clinical utility of biomarkers of endothelial activation in sepsis-a systematic review. Crit Care 2012; 16 (1): R7.

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.

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: **“AVALIAÇÃO CLÍNICA E FUNCIONAL DE NOVOS BIOMARCADORES PARA ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO NA SEPSE EM PACIENTES COM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS E NEUTROPENIA FEBRIL”**

Responsáveis pelo projeto: **Dr. Erich Vinicius de Paula**

Maiara Marx Luz Fiusa

Eu, _____,
idade: _____, Data de Nascimento: _____, RG: _____,
HC: _____, Residente à Rua/Av.: _____,

CEP: _____, Telefones: _____,

concordo em participar do presente estudo, após estar absolutamente esclarecido (a) dos propósitos do mesmo.

Responsável pelo sujeito de pesquisa: _____,
Idade: _____, RG: _____, Grau de Parentesco: _____,
Residente à Rua/Av. _____,

CEP: _____, Telefones: _____,

Este estudo pretende identificar a presença de substâncias (mediadores) que podem estar relacionadas ao risco de infecções que podem ocorrer após a quimioterapia, em um período em que há redução das defesas naturais do corpo. Este período é conhecido como neutropenia febril. O objetivo desta pesquisa é investigar se a dosagem de alguns destes mediadores em seu sangue poderia prever o tamanho do risco de infecção grave em pacientes que futuramente se apresentem na mesma situação em que você se encontra hoje. Isto pode permitir uma melhoria do tratamento da neutropenia febril no futuro.

Para isso, coletaremos 8 mL de sangue para análise dos biomarcadores, em uma única coleta. O sangue será coletado por punção de veia periférica. Nenhum outro exame será feito nesta amostra de sangue.

Os riscos a que o senhor (a) estará sujeito ao participar da coleta são hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da punção venosa. Este estudo não oferecerá aos sujeitos da pesquisa outros riscos importantes.

O benefício esperado na sua participação seria a sua contribuição para melhor entendimento desta doença e conseqüentemente um tratamento mais eficaz para este tipo de doença no futuro.

Outras informações:

1. O voluntário estará livre para desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
2. O voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
3. O material colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos e gostaríamos de saber se o senhor (a) concorda que este material possa ser armazenado.

Sim Não

4. Caso seja realizado um outro estudo com este material, o senhor (a) será devidamente informado e questionado se concorda na participação de um outro estudo. Este novo estudo só será realizado após nova autorização do comitê de ética em pesquisa desta instituição.
5. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade será sempre preservada.
6. A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente em qualquer serviço de nosso hospital.

Qualquer tipo de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa o senhor (a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP (Fone: 19-3521-8936)

Campinas ____/____/____

Assinatura do Voluntário

Campinas ____/____/____

Assinatura do Responsável Legal
(Caso menor de 18 anos)

Responsável pela explicação deste Termo de Consentimento:

Erich Vinicius de Paula
Médico Pesquisador
Fone: (19) 3521-8756

Maiara Marx Lux Fiusa
Pesquisadora Responsável
Fone: (19) 3521-8617

Anexo 2 – Artigo de Revisão publicado no periódico *Recent Patents on Biomarkers*

Recent Patents on Biomarkers 2012, 2, 000-000

1

Vascular Wall-Related Biomarkers in Sepsis: A Review of Current Evidence and a Critical Appraisal Of Recent Patents

Maiara Marx Luz Fiusa¹, Joyce Maria Annichino-Bizzacchi² and Erich Vinícius De Paula*¹

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

Received: April 7, 2012; Accepted: April 10, 2012; Revised: April 19, 2012

Abstract: Sepsis is a leading cause of death in both developed and developing world that still represents one of the major challenges to biomedical research. Treatment of sepsis is largely based on antibiotics and supportive measures, so that early diagnosis of sepsis and of its end-organ complications, could potentially improve clinical outcomes. In the last two decades, there has been intensive research activity in the field of biomarker for sepsis. However, despite a few interesting positive results, incorporation of these tools into clinical practice has been slow, maybe due to limitations in their clinical impact in “real-life” patient care. In the last years, the concept of the endothelium as the most important target organ in sepsis gained momentum, leading to the search for new vascular wall-related biomarkers in sepsis. Promising results have been published in the last years, along with very recent patent filing activity. Here we briefly review the rationale and available data on the use of vascular wall-related biomarkers in sepsis. In addition, we discuss the trends in research & development activity in this area, by presenting a selected number of patents filed in the last 10 years to the area of vascular-wall biomarkers in sepsis pointing areas for commercial development.

Keywords: Angiopoietin, endothelium, microvascular permeability, patents, sepsis, sFlt-1, vascular-wall, VEGF.

INTRODUCTION

The definition of sepsis is that of a systemic inflammatory response in a patient with a microbiological or clinically defined infection. Sepsis is one of the most important causes of death in developed countries, representing a leading cause of death in these areas [1]. The complexity of the cascade of cellular and molecular events characteristic of the host response to sepsis, namely the concomitant activation of several cascades, many of which with overlapping and redundant effects, turned the basic, translational and clinical research about sepsis one of the most challenging areas of biomedical science [2]. Several examples of frustrating results in the translation of basic to clinical knowledge illustrate the difficulties of studying sepsis [3-5]. As a result, in a time when target-specific therapies are a reality in many areas of medicine, the treatment of sepsis remains largely unchanged in the last ten to twelve years, with improvements concentrated in the supportive care to these patients. Efforts to strengthen the basic knowledge about the pathogenesis of sepsis are ongoing, as areas outside the classically studied inflammation and hemostasis systems begin to gain importance in sepsis research. Indeed, the recent failure of anticoagulant agents as target-specific therapies in sepsis [6] highlights the importance of gaining a better understanding of key pathogenic elements of the sepsis cascade, so that translational and clinical research in new biomarkers and new targeted therapies reach farther than what has been achieved so far.

A biomarker can be defined as “a characteristic objectively measured as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes of pharmacologic responses to therapeutic intervention” [7]. In the context of sepsis, the benefits of a clinically relevant biomarker would include: (a) the possibility of early diagnosis which could potentially result in better treatment outcomes; (b) more rational risk-stratification, which would facilitate clinical decision-making and family information; and (c) improvements in the study and in the implementation of new therapies, as such biomarkers could be important efficacy surrogate markers of new therapies. In fact, the quest for a good biomarker or a good combination thereof is one of the most active areas of sepsis research. However, although more than 100 distinct molecules of systems have been investigated, the clinical management of sepsis still does not include a widely accepted and used biomarker [8].

BIOMARKER RESEARCH AS A MULTI-STEP PROCESS

The development of a biomarkers is a multi-step research process that has been elegantly described by Sackett & Haynes that divided it in four phases or scientific questions [9]. In this process, the demonstration of a difference in the concentration of a specific biomarker between patients and healthy controls is only the initial step. Most of the data on biomarker research refers to this step, which is usually characterized by studies performed in highly controlled environments, very different from “real-life” situations. For this reason, this first step should be always followed by a validation of these observations in a less controlled environment, usually represented by an independent study with higher number of patients, few exclusion criteria and ideally, in multiple

*Address correspondence to this author at the Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Rua Carlos Chagas 480 – Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, Campinas, SP, Brazil, 13083-970; Tel: +55 19 3521 8756; Fax: +55 19 3521 8600; E-mail: erich@unicamp.br

centers. Finally, studies that evaluate the clinical significance of a specific biomarker, correlating its use with robust outcomes related to relevant questions such as prognosis, survival or health economics, complete the biomarker research program. Whenever one evaluates evidence, either from published papers or from patents on sepsis biomarkers, the importance of this multi-step process should be remembered.

IMPORTANCE OF VASCULAR-WALL RELATED BIOMARKERS IN SEPSIS

In the last decades, most of the translational and clinical research in sepsis, including the search for relevant biomarkers, focused on inflammation and hemostasis, based on the assumption that hypercoagulation was a key pathogenic factor in sepsis, and that blocking discrete points of the cascade of events of sepsis could result in clinical improvements [10]. As frustrating results from clinical trials in sepsis patients accumulated, pointing to a much more complex picture, sepsis research began to shift from these classical areas, resulting in a broader view of candidate pathogenic elements for sepsis. Studies from the last decades clearly indicate that the endothelium as a central target organ in sepsis [11]. Located in the blood-tissue interface, the endothelium is the organ where key pathogenic events of sepsis occur, events that have been collectively referred to by the generic term “endothelial activation”. Endothelial activation can be regarded as any change in the endothelium quiescent status induced by the presence of a pathogen, and involves inflammation, hemostasis, and endothelial-barrier maintenance. Regarding the latter, endothelial-barrier maintenance has been recently acknowledged as one of the most promising targets in sepsis, which illustrates the role of the endothelium not only as an intermediate, but also as a key target-organ in sepsis [12]. For all these reasons, it is not surprising that recent research efforts have been focused on the identification of vascular-wall related biomarkers in sepsis, as discussed in the next section.

BRIEF REVIEW OF AVAILABLE EVIDENCE

A recent systematic review about vascular-wall related biomarkers in sepsis revealed that 61 scientific articles have been published evaluating the association of vascular-wall related biomarkers with clinical outcomes in adults patients with sepsis, excluding special populations such as patients with febrile neutropenia, malaria and others [8]. The authors point that several of these studies report positive associations between biomarkers and clinical outcomes such as septic shock and death. However, when subjected to a quality evaluation using the Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation (GRADE) system for assessing the quality of evidence [13], all studies were assigned a GRADE level of “low quality” [8], highlighting the importance of a critical evaluation of the evidence in the area, as well as the care in the design of future studies. To put the discussion about recent patents on vascular-wall related biomarkers into the context of current biomarker research, we will now briefly review published data about specific vascular wall-related biomarker categories in sepsis. For additional details, the readers are referred to excellent and comprehensive reviews about this subject [8, 14]. For the purpose of this discussion, vascular-wall related biomarkers will be divided in the following categories: (a) VEGF axis-related; (b) Angiopoietin-related; (c) adhesion molecules-related; (d) vasomotor tone-related; and (e) coagulation-related Fig. (1).

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-related Biomarkers

VEGF is one of the most important regulators of angiogenesis, and a potent modulator of vascular permeability. In fact, VEGF seems to be more than 50,000 times more potent than histamine in inducing vascular permeability [15]. These two characteristics are not associated by chance, but reflect the fact that the capability to disrupt the endothelial barrier is a *sine qua non* condition for angiogenesis. During embryonic

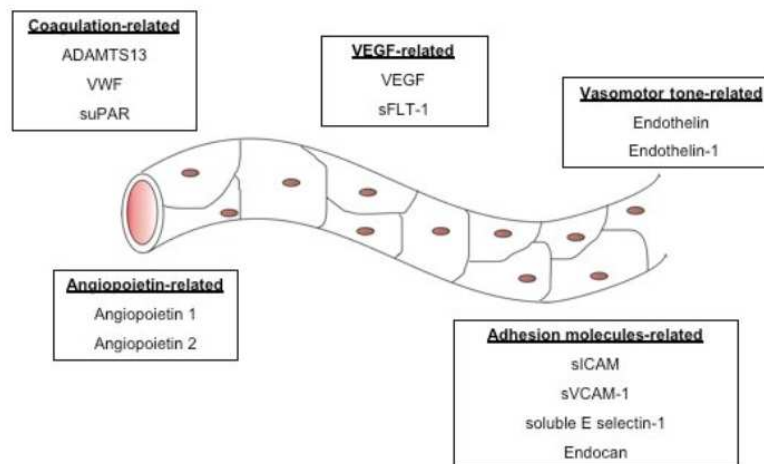


Fig. (1). Categories of vascular wall biomarkers.

angiogenesis, a process for which VEGF is essential, the assembly-disassembly of primitive endothelial tubes, followed by endothelial cell incorporation, is a dynamic and finely regulated part of the development of the circulatory system [16]. VEGF binds to one of its four known receptors, expressed mainly in endothelial cells, of which VEGFR-2 seems to be the most important. A soluble form of VEGF receptor-1, sFlt-1 is naturally produced by alternative splicing, acting as a decoy receptor, thus antagonizing VEGF [17]. The role of VEGF and sFlt-1 in the pathogenesis of sepsis was elegantly demonstrated in a series of experiments with animal models and patients with sepsis [18]. All diagnostic accuracy studies evaluating VEGF and sFlt-1 as biomarkers in sepsis yielded results that suggest that these molecules are promising candidates for use in clinical practice [19]. Even in cancer, where VEGF levels can increase as a result of baseline disease, our group has demonstrated that VEGF and sFlt-1 levels correlate with sepsis severity scores [20].

Angiopoietins-related Biomarkers

Like VEGF, angiopoietins 1 and 2 are key molecules for the embryonic development of the circulatory system, acting in concert to regulate the assembly and disassembly of endothelial primitive tubes during angiogenesis [16]. Angiopoietin 1 and 2 present antagonistic functions, with angiopoietin 1 present vessel stabilization effects, and angiopoietin 2 being associated with vessel destabilization. Not surprisingly, these endothelial barrier-maintenance modulators have also been associated with pathologic conditions in which endothelial barrier maintenance is involved such as sepsis. In fact, angiopoietin 2, which increases in sepsis patients in a similar fashion as VEGF, is currently regarded as the most promising sepsis biomarker, as several reports demonstrate the association of their levels with robust clinical outcomes, in several populations [8, 21].

Adhesion-molecules-related Biomarkers

The recruitment of leukocytes to sites of injury by pro-inflammatory signals is a complex and finely tuned process that involves several classes of molecules including selectins, integrins, and vascular adhesion molecules. During sepsis, expression of these molecules can be induced by pro-inflammatory stimuli, when receptors of these molecules are also shed into circulation after activation [22]. Therefore, circulating levels of these molecules can reflect the magnitude of the inflammatory response in sepsis, which provides a biological rationale for their use as biomarkers. Whether this hypothesis can be translated into measurable and clinically relevant biomarkers is still a matter of debate. One should acknowledge that as a general category, adhesion molecules, including soluble intercellular adhesion molecule (sICAM), soluble vascular cell adhesion molecule (sVCAM-1), soluble E selectin-1, and Endocan, are the most explored vascular wall-related biomarkers in sepsis. Despite the large number of studies demonstrating increased levels of these biomarkers in sepsis, not all studies could demonstrate an association of these biomarkers with clinical outcomes. Summing up, it is possible to state that circulating levels of these molecules do reflect endothelial activation in sepsis,

with most, but not all, studies showing a correlation with clinically relevant endpoints. However, additional studies are needed to understand other variables that influence circulating levels of these biomarkers, and to define their precise role in clinical practice [8, 14].

Vasomotor-tone Related Biomarkers

Endothelin (ET) is an endothelium-derived peptide with potent and prolonged vasopressor and vasoconstrictor effects that participates in the regulation of vascular tone and systemic blood pressure (Wey *et al.* 1994, Yanagisawa *et al.* 1988). Epinephrin, thrombin, IL-1 and shear stress, elements that are present in sepsis, can induce the production of ET, and ET-1 has been explored as a biomarker of sepsis, with promising results suggesting that this biomarker could be an independent predictor of morbidity and mortality in severe sepsis [23].

Coagulation-related Biomarkers

The potential role of coagulation activation in the pathogenesis of sepsis makes it attractive to explore the role of coagulation-related proteins as sepsis biomarkers. Von Willebrand Factor (VWF) and ADAMTS13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motif) are two endothelium-associated proteins that have been explored as sepsis biomarkers. VWF is an acute phase protein produced in ultra-large multimers that normally undergo proteolysis by ADAMTS13. Under physiological conditions, ultra-large VWF multimers are rarely detected. In severe sepsis, VWF levels increase while ADAMTS13 have been shown to decrease in studies with very limited number of patients. This led to the hypothesis that low ADAMTS13, resulting in increased ultra-large VWF multimers, could be associated with microvascular thrombosis in sepsis, thus providing a biological rationale for its use as a biomarker. However, results from research accuracy studies with these biomarkers are limited and have presented somewhat inconsistent results. There is a clear increase of VWF during sepsis, with a few, but not all published studies, demonstrating an association between VWF levels clinical endpoints such as survival. There are also inconsistent results regarding the capability of VWF levels to discriminate sepsis from other inflammatory conditions. To date, the biomarker can be used as a marker of endothelial activation during sepsis, but its clinical use is still precluded by unanswered questions about its use in this context. Regarding ADAMTS13, the number of patients in published studies is still very limited to allow any definite conclusion [24, 25].

Another coagulation-related biomarker that has been much more actively investigated in sepsis is soluble urokinase plasminogen activator (suPAR). suPAR has been evaluated in several studies in patients with different presentations of infectious diseases [26]. In a large study with critically ill patients, suPAR levels were associated with disease severity and were strong predictors of intensive care unit (ICU) survival at intensive care unit admission [27]. Based on what has been published so far, suPAR may be useful as a prognostic marker at the admission of critically ill patients.

RECENT PATENTS ON VASCULAR WALL-RELATED BIOMARKERS IN SEPSIS

We will now discuss a few patents and patent applications in the field of sepsis biomarkers from the last five years. These patents were selected because they involve directly or indirectly, mediators that are associated with vascular wall-related functions, and allow a current perspective of the R&D activity in the field.

- US patent 7399602/B2 from July 2008 [28]: this patent refers to the use of soluble urokinase plasminogen activator (suPAR) in human fluids as a biomarker for the diagnosis and prognosis of respiratory infections caused by organisms such as *Streptococcus pneumoniae* and *Mycobacterium tuberculosis*. The patent is based on the finding that levels of this biomarker are increased in serum, plasma and urine and from patients with these conditions, and that levels are associated with disease progression and death. As mentioned earlier, suPAR may be useful as a prognostic marker at the admission of critically ill patients, as well as in combination with other biomarkers.
- US patent 7645573 B2 from January 2010 [29]: this patent refers to the use of combined determinations of biomarkers, as opposed to evaluation of a single biomarker, in patients with sepsis. The patent refers to the measurement of these biomarkers at the mRNA level, and to the methods used for these determinations, such as production of specific kits. The concept is to use this so-called "biomarker profile" to obtain early diagnosis and the possibility of laboratory monitoring of the clinical course of sepsis.
- US patent 8029982 B2 from October 2011[30]: this patent refers to the use of a pre-defined set of biomarkers, as opposed to a single biomarker in patients with or at-risk for sepsis. The protein expression of these biomarkers is measured in platforms that allow the combined determination of several biomarkers in a single sample. The set of biomarkers proposed in the invention was validated by statistical methods in patients with sepsis, and includes some vascular wall-related biomarkers.
- US patent application 0145883/A1 from June 2008 [31]: this patent application refers to the development of diagnostic kits for the determination of sphingosine-1-phosphate phosphatase 2 (SPP2) levels in immunological and inflammatory diseases such as psoriasis, sepsis and others. SPP2 is involved in the degradation of S1P, a lipid mediator involved in several vascular tone responses, as well as in the regulation of endothelial barrier maintenance. The background is based on the finding of altered expression of SPP2 in cells stimulated by TNF- α and LPS, and in samples from patients with psoriasis. Since the original report of these data in 2008 from the same group that filed the patent [32], no additional publications have become available in the subject.
- US patent application 0117099/A1 from May 2009[33]: the patent refers to the use of extracellular histones as targets or biomarkers of conditions that include sepsis, and is based on the demonstration of their role in sepsis [34]. Extracellular histones induce innate immune re-

sponses and from a mechanistic point of view can be a very interesting biomarker of sepsis.

- US patent application 0118161/A1 from May 2009[35]: this patent refers to the use of a specific fragment of VWF, the A2 domain, for therapeutic and diagnostic purposes in conditions such as sepsis. The A2 domain contains the ADAMTS13 activation site, which cleaves VWF. There has been no publication on the use of the A2 domain as a biomarker in sepsis, and no human data is presented at the patent application.
- US patent application 0160171/A1 from June 2010 [36]: the patent refers to methods used to determine Granzyme B in platelets as a biomarker of sepsis. The inventor demonstrated that Granzyme B, a cytotoxic protease, is upregulated in platelets from patients with sepsis [37]. More recently, increased granzyme levels have also been demonstrated in critically ill patients [38].
- US patent application 0008804/A1 from September 2010 [39]: this patent refers to the use of angiopoietin 1, angiopoietin 2 and the ratio of angiopoietin 2:1 as biomarkers of sepsis. The evidence behind this patent has been extensively discussed above. As previously mentioned, these biomarkers are regarded by some authors as the most promising vascular wall-related sepsis biomarkers.
- US patent application 0259350/A1 from October 2011 [40]: this patent refers to the detection of stromal derived factor 1 (SDF-1) in the urine of patients with acute kidney disease, claiming urinary levels of this cytokine to be a early and specific marker of acute renal injury. The patent lists multiorgan failure as an interesting setting for the use of this biomarker. Increased levels of SDF-1 in the blood from patients with sepsis compared to controls has been recently reported [41].

CURRENT & FUTURE DEVELOPMENTS

Despite the fact that vascular wall-related biomarkers are one of the most active areas of research in the field of sepsis biomarkers, a lot of the available data are relatively recent compared to the use of acute-phase proteins as sepsis biomarkers, which precludes the proposal of practical guidelines for the use at this moment. Given the dynamic nature of the field, it is possible that this scenario can be changed in a few years from now, as biomarkers such as angiopoietins, suPAR and others are challenged in studies designed to simulate more closely the so-called "real-life" situations, which should be the ultimate test for the implementation of a biomarker. Such studies should ideally by multicentric studies in which biomarkers are tested in local laboratories under less controlled conditions, include patients with less stringent inclusion criteria regarding the time of ICU admission and the presence of comorbidities and have enough statistical power to reach definitive conclusions.

As shown above, recent patent applications involve newly discovered biomarkers such as angiopoietins and extracellular histones, as well as the concept to evaluate several biomarkers in the same patient. In fact, several other patent applications have been recently filed involving the use of specific combinations of biomarkers. This clearly shows a

trend towards the use of platforms that allow a broader evaluation of biomarkers. Though attractive from a theoretical standpoint, the validation of these assays can be a challenge, due to the redundancy and to differences in the relative importance (hierarchy) of proteins in the cellular cascades of sepsis. From a philosophical standpoint, this challenge fits into the contemporary challenge of handling huge amounts of data and struggling to get the right information out of it. This trend can also be viewed as a perception, after decades of relatively frustrating results, that it might not be possible to identify a single biomarker that can provide accurate and clinically relevant information in sepsis. Whether this is a specific and unmodifiable characteristic of sepsis, or the result of our current lack of knowledge about the most critical mediators of the pathogenesis of sepsis, remains to be determined. The relatively recent shift in sepsis research, towards processes related to endothelial barrier maintenance is a promising feature not only for the treatment of sepsis [12], but also for its diagnosis and management.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from FAPESP (2011/2829-7 and 2011/3078-5). The Hematology and Hemotherapy Center - UNICAMP, forms part of the National Institute of Science and Technology of Blood, Brazil (INCT do Sangue -CNPq / MCT / FAPESP).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest that might influence the contents of this review.

REFERENCES

- [1] 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.
- [2] Remick DG. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol* 2007;170(5):1435-44.
- [3] Abraham E, Reinhart K, Opal S, Demeyer I, Doig C, Rodriguez AL, *et al.* Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: A randomized controlled trial. *JAMA* 2003;290(2):238-47.
- [4] Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, *et al.* Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344(10):699-709.
- [5] Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I, *et al.* Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: A randomized controlled trial. *JAMA* 2001;286(15):1869-78.
- [6] Marti-Carvajal AJ, Sola I, Lathyris D, Cardona AF. Human recombinant activated protein C for severe sepsis. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;3:CD004388.
- [7] Biomarkers Definitions Working Group B. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69(3):89-95.
- [8] Xing K, Murthy S, Liles WC, Singh JM. Clinical utility of biomarkers of endothelial activation in sepsis-a systematic review. *Crit Care* 2012; 16(1):R7.
- [9] Sackett DL, Haynes RB. The architecture of diagnostic research. *BMJ* 2002;324(7336):539-41.
- [10] Levi M, de Jonge E, van der Poll T. Sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Thrombolysis* 2003;16(1-2):43-7.
- [11] Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol* 2008;83(3):536-45.
- [12] Goldenberg NM, Steinberg BE, Slutsky AS, Lee WL. Broken barriers: A new take on sepsis pathogenesis. *Sci Transl Med* 2011;3(88):88ps25.
- [13] Guyatt GH, Oxman AD, Vist GE, Kunz R, Falck-Ytter Y, Alonso-Coello P, *et al.* GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ* 2008;336(7650):924-6.
- [14] Paulus P, Jennewein C, Zacharowski K. Biomarkers of endothelial dysfunction: Can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomarkers* 2011;16 (Suppl 1):S11-21.
- [15] Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146(5):1029-39.
- [16] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;473(7347):298-307.
- [17] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9(6):669-76.
- [18] 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.
- [19] Yang KY, Liu KT, Chen YC, Chen CS, Lee YC, Perng RP, *et al.* Plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 levels predict outcomes of pneumonia-related septic shock patients: A prospective observational study. *Crit Care* 2011;15(1):R11.
- [20] Alves BE, Montalvao SA, Aranha FJ, Lorand-Metze I, De Souza CA, Annichino-Bizzacchi JM, *et al.* Time-course of sFlt-1 and VEGF-A release in neutropenic patients with sepsis and septic shock: A prospective study. *J Transl Med* 2011;9:23.
- [21] Alves BE, Montalvao SA, Aranha FJ, Siegl TF, Souza CA, Lorand-Metze I, *et al.* 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.
- [22] Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med* 2003;9(6):263-8.
- [23] Piechota M, Banach M, Irzanski R, Barylski M, Piechota-Urbanska M, Kowalski J, *et al.* Plasma endothelin-1 levels in septic patients. *J Intensive Care Med* 2007;22(4):232-9.
- [24] Claus RA, Bockmeyer CL, Budde U, Kentouché K, Sossdorf M, Hilbert 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.
- [25] 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.
- [26] Donadello K, Scolletta S, Covajes C, Vincent JL. suPAR as a prognostic biomarker in sepsis. *BMC Med* 2012;10:2.
- [27] Koch A, Tacke F. Why high suPAR is not super - diagnostic, prognostic and potential pathogenic properties of a novel biomarker in the ICU. *Crit Care* 2011;15(6):1020.
- [28] Hellerup, J.E.-O. Method of prognosticating respiratory bacterial infection using urokinase receptor measurement. US7399602 (2008).
- [29] Ivey, R.M., Gentle, Jr., T. M., Moore, R. L., Towns, M. L., Bachur Jr., M., Rosenstein, R. W., Goldenbaum, P. E., Shi, S., Copertino, D., Garret, J., Tice, D. Diagnosis of sepsis or SIRS using biomarker profiles. US7645573 (2010).
- [30] Kingsmore, SF., Lejnine, SJ., Driscoll, N., Tchenev, VT.. Biomarkers for Sepsis. US8029983B2 (2011).
- [31] Baumruker, T., Billich, A., Mechtcheriakova, D., Wlachs, A. Biomarkers in inflammatory diseases patent. US0145883A1 (2008).
- [32] Mechtcheriakova D, Wlachs A, Sobanov J, Kopp T, Reuschel R, Bomančin F, *et al.* Sphingosine 1-phosphate phosphatase 2 is induced during inflammatory responses. *Cell Signal* 2007;19(4):748-60.
- [33] Esmon, C.T., Xu, J., Zhang, X. Extracellular Histones as biomarkers for prognosis and molecular target for therapy patent. US20090117099 (2009).

- [34] Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, *et al.* Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med.* 2009 Nov;15(11):1318-21.
- [35] Cruz, M.A. Treatment of medical condition with A2 domain of Von Willebrand factor. US20090118161A1 (2009).
- [36] Freishtat, R.J. Methods for detection of sepsis. US20100160171 (2010).
- [37] Freishtat RJ, Natale J, Benton AS, Cohen J, Sharron M, Wiles AA, *et al.* Sepsis alters the megakaryocyte-platelet transcriptional axis resulting in granzyme B-mediated lymphotoxicity. *Am J Respir Crit Care Med* 2009 ;179(6):467-73.
- [38] Napoli AM, Fast LD, Gardiner F, Nevola M, Machan JT. Increased granzyme levels in cytotoxic T lymphocytes are associated with disease severity in emergency department patients with severe sepsis. *Shock* 2012;37(3):257-62.
- [39] Kain, K.C., Liles, W.C. Angiopoietins 1 and 2 biomarkers for infectious diseases that compromise endothelial integrity. US201100088041 (2011).
- [40] Westenfelder, C. Methods of using SDF-1 (CXCL12) as a diagnostic and mesenchymal stem cell (multipotent stromal cell)-specific therapeutic biomarker for the treatment of kidney injury and other major organs. US20110259350 (2011).
- [41] Patschan SA, Patschan D, Temme J, Korsten P, Wessels JT, Koziolek M, *et al.* Endothelial progenitor cells (EPC) in sepsis with acute renal dysfunction (ARD). *Crit Care* 2011;15(2):R94.

Anexo 3 – Artigo original relativo a este estudo, submetido para publicação

A high angiopoietin-2/angiopoietin-1 ratio predicts septic shock development in cancer patients with chemotherapy-associated febrile neutropenia

Maiara Marx Luz Fiusa ¹, Carolina Costa-Lima ¹, Gleice Regina de Souza ¹, Afonso Celso Vigorito ¹, Franciso Jose Penteado Aranha ¹, Irene Lorand-Metze ², Joyce M Annichino-Bizzacchi ², Carmino Antonio de Souza ², Erich V De Paula ^{1,3}, MD, PhD

¹ Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas; ² Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, ³ Department of Clinical Pathology, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

Corresponding author

Erich V De Paula, MD, PhD
Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP
13083-887
Campinas, SP, Brazil
Phone: +55 19 35218734
Fax: +55 19 35218600
Email: erich@unicamp.br

Email address for all authors:

Maiara Marx Luz Fiusa: maiaramarx@gmail.com
Carolina Costa-Lima: caroll@unicamp.br
Gleice Regina de Souza: gracekelly.campinas@gmail.com
Afonso Celso Vigorito: afonso@unicamp.br
Franciso Jose Penteado Aranha: aranha@unicamp.br
Irene Lorand-Metze: ilmetze@unicamp.br
Joyce M Annichino-Bizzacchi: joyce@unicamp.br
Carmino Antonio de Souza: carmino@unicamp.br
Erich V De Paula: erich@unicamp.br

Abstract

Introduction: Endothelial barrier breakdown is a hallmark of septic shock, and proteins that physiologically regulate endothelial barrier integrity are emerging as promising biomarkers of septic shock development. Patients with cancer and febrile neutropenia (FN) present a higher risk of sepsis complications such as septic shock. Nonetheless, these patients are normally excluded or under-represented in sepsis biomarker studies. The aim of our study was to validate the measurement of a panel of microvascular permeability modulators as biomarkers of septic shock development in cancer patients with chemotherapy-associated FN.

Methods: This was a prospective diagnostic accuracy study performed in two distinct in-patient units of a University Hospital. Levels of VEGF-A, sFlt-1 and angiopoietin (Ang) 1 and 2 were measured after the onset of neutropenic fever, in conditions designed to mimic the real-world use of a sepsis biomarker. Patients were divided in two outcome groups, based on the development of septic shock within 28 days from fever onset.

Results: Ninety-nine consecutive patients were evaluated in the study, of which 20 developed septic shock and 79 were classified as non-complicated FN. VEGF-A and sFlt-1 levels were similar between both outcome groups. In contrast, Ang-2 concentrations were increased in patients with septic shock, whereas an inverse finding was observed for Ang-1, resulting in a higher Ang-2/Ang-1 ratio in patients with septic shock (5.29, range 0.58-57.14) compared to non-complicated FN (1.99, range 0.06-64.62; $P = 0.01$). After multivariate analysis, the Ang-2/Ang-1 ratio remained an independent factor for shock septic development and 28-day mortality.

Conclusions: The prognostic impact of a high Ang-2/Ang-1 ratio as a biomarker for septic shock was prospectively validated in an independent and representative cohort of cancer patients with chemotherapy-associated FN.

Keywords: sepsis; septic shock; biomarkers; angiopoietin; VEGF; sFlt-1; endothelial barrier; febrile neutropenia; cancer

INTRODUCTION

Septic shock is one of the most severe complications of sepsis, frequently preceding multi-organ dysfunction syndrome and death. Cancer patients are at an increased risk of sepsis complications for several reasons including the need for frequent invasive procedures, the effects of cancer on nutritional status and immunity, and the immunosuppressive effects of chemotherapy [1]. As life expectancy increases, so does the prevalence of age-related morbidities such as cancer, considered one of the most important contributing factors for the increasing incidence of sepsis [2]. In this context, the discovery and validation of new biomarkers for septic shock development is regarded as a major research objective in the field [3, 4]. However, of all biomarkers reported as potentially informative in sepsis, only a small fraction is eventually validated, so that clinical application still lags behind. In fact, most reports about sepsis biomarkers consist in initial demonstration of differences in biomarker levels between patients and healthy individuals, frequently performed under excessively controlled experimental environments. Validation of these findings must involve larger studies in independent populations, and in more challenging conditions resembling “real-world” practice [3, 5].

In the last decade, the cellular and molecular mechanisms that regulate endothelial barrier integrity have been described [6]. In the embryo, VEGF-A, sFlt-1, angiopoietin (Ang)-1 and Ang-2 play critical roles in the physiological process of angiogenesis, during which endothelial barrier is constantly assembled and disassembled, to allow the incorporation of new vessels sprouts. While VEGF-A and Ang-2 are involved in the destabilization of endothelial cell junctions, sFlt-1 and Ang-1 present antagonistic functions, stabilizing the endothelial barrier. After the initial demonstration that the mechanisms that regulate endothelial barrier formation in the embryo are also involved in the pathological disruption of the endothelial barrier in adults during sepsis [7], several studies explored the role of these proteins as biomarkers of septic shock development. Encouraging results were reported by several groups, and Ang-1 and Ang-2 emerged among the most promising endothelial-associated sepsis biomarkers [8-14].

Patients with cancer and febrile neutropenia (FN) are one of the populations with the highest risks of sepsis-related mortality [15, 16]. In these patients, septic shock can evolve as a fulminant complication, despite aggressive treatment with broad-spectrum antibiotics and best supportive care. Nevertheless, these patients are usually excluded or largely underrepresented in studies about sepsis biomarkers and management. In a small exploratory study, we previously demonstrated that levels of modulators of endothelial permeability such as VEGF-A and Ang-2 were altered in patients with FN that developed septic shock [17, 18]. Here we sought to validate the use of these new biomarkers in a larger and independent cohort of FN patients, under conditions that could allow the generalization of our results to clinical practice.

MATERIAL AND METHODS

Patients

The study was conducted at the Hematopoietic Stem Cell Transplantation and at the Hematology in-patient units of University of Campinas between March 2011 and March 2012. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Committee of Ethics in Research of the Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. Written informed consent was obtained from all patients prior to any study procedure. Inclusion criteria were: (1) fever ($T \geq 38^{\circ}\text{C}$) over a 1 hour observation period, (2) chemotherapy-induced severe neutropenia, characterized by an absolute neutrophil count $< 0.5 \times 10^9/\text{L}$ at the time of fever onset, and (3) persistence of severe neutropenia until the time of blood sample collection. Demographic and clinical data were obtained from the medical records.

Sepsis definitions and clinical scores

In accordance with FN management protocols, an infectious etiology was assumed for all patients with post chemotherapy neutropenia with new onset of fever [19]. Blood and urine cultures were immediately obtained and broad spectrum antibiotics initiated. All patients underwent chest radiography. Other

imaging studies were performed when judged necessary by the attending physician. Sepsis was defined by the presence of two or more of the following: (1) temperature > 38°C, (2) heart rate > 90 beats/min, (3) respiratory rate > 20 breaths/min or PaCO₂ < 32 mmHg, and a microbiologically proven or clinically evident source of infection. A diagnosis of septic shock was established when sepsis was complicated by hypoperfusion or hypotension (systolic arterial pressure < 90 mmHg or dropping > 40 mmHg from baseline), despite adequate volume resuscitation [20]. Severity of illness was assessed by calculating the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score [21], and FN risk stratification was performed by calculation of the Multinational Association for Supportive Care In Cancer (MASCC) score [22]. Both scores were calculated at the time of sample collection.

Study design

This was a prospective non-interventional study performed according to the STARD (Standard for the Reporting of Diagnostic Accuracy Study) guidelines [23]. All in-patients from the Hematology or from the Bone Marrow Transplantation units with new onset FN that met the inclusion criteria were invited to participate. The study was deliberately designed to mimic the conditions in which a sepsis biomarker would be ordered: (i) samples were collected and initially processed by the hospital laboratory staff; (ii) samples were obtained in the first routine sample collection available after enrollment (usually in the following morning); and (iii) neither the prior use of antibiotics, nor the time elapsed since fever onset were considered exclusion criteria for enrollment, as long as the patients remained with severe neutropenia. As per local protocol, the first routine sample collection for all admitted FN patients includes a complete blood count (in which the persistence of severe neutropenia was confirmed) and C-reactive protein (CRP) measurement.

Serum levels of VEGF-A, sFlt-1, Ang-1 and Ang-2 were measured by an individual blinded to patient outcomes, in duplicate, using commercial enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to manufacturer's instructions. Samples were centrifuged at

1000g (4°C, 15 min) and serum was stored at -80°C until analysis. The sensitivities of the assays for VEGF-A, sFlt-1, Ang-1 and Ang-2 were 9 pg/ml, 3.5 pg/ml, 3.4pg/ml and 8.3pg/ml respectively. The intra and interassay coefficients of variation of all tests were within the range informed by the manufacturer (range 2.4%-10.4%).

Statistical Analysis

Patients were divided in two outcome groups according to the presence or absence of septic shock at any time point before the resolution of FN or at a maximum of 28 days after enrollment (in cases of prolonged neutropenia): (i) non-complicated FN or (ii) septic shock. Differences in continuous variables between patients from each subgroup were analyzed using the Mann-Whitney 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) analysis was performed between sepsis severity scores and biomarker levels. Receiver operator characteristics (ROC) procedures were used to identify optimal cut-off values of biomarker concentrations to differentiate distinct outcome groups. To evaluate the effect of the Ang-2/Ang-1 ratio as a continuous variable on the risk of septic shock development and sepsis-related mortality, a Cox Proportional-hazards model was used assuming a graded relation between the ratio and either outcome. To evaluate whether there was a non-linear association between the risk of septic shock and the Ang-2/Ang-1 ratio, a binary logistic regression model was used, in which the ratio was dichotomized by the median and by an optimal cut-off. All multivariate analysis models were adjusted for covariates with a *p* value < 0.10 in univariate analysis. Survival curves were estimated using the Kaplan-Meier method. A *p* value less than or equal to 0.05 was considered statistically significant. All statistical analysis were performed with the SPSS package v. 17.2 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and the GraphPad Prism Software (GraphPad Prism Software Inc. San Diego, California, USA).

RESULTS

Patients Characteristics

One-hundred twenty patients with FN were identified in both in-patient units during the study period. All patients agreed to participate, but only the 99 patients that met all inclusion criteria were maintained in the study. Twenty-one patients were excluded because the absolute neutrophil count had increased to above $0.5 \times 10^9/L$ at the time of sample collection (Figure 1). Of note, none of these 21 patients developed septic shock. Of the 99 episodes of FN, 20 (19.8%) evolved to septic shock, and 17 (16.8%) were fatal. All deaths were attributed to complications of septic shock, and occurred in after a median of 13 days from sample collection (range 3-28). Seventy-eight FN episodes (78.8%) were classified as high-risk FN, based on a MASCC score ≤ 21 [24]. There were no significant clinical and demographic differences between patients with non-complicated FN and septic shock with respect to age, diagnosis, MASCC score and CRP. A higher SOFA score in patients that developed septic shock was the only significant difference observed at baseline between the two outcome groups (Table 1). The median time to septic shock development after sample collection was 3 days (range 1-17).

Serum levels endothelial permeability modulators according to the development of septic shock

No statistical significant difference could be detected between VEGF-A and sFlt-1 levels in patients with non-complicated FN compared to patients that developed septic shock (Figure 2). Serum concentrations of Ang-1, an endothelial barrier-stabilizing factor, were higher in patients with non-complicated FN (1220.0 pg/ml, range 32.5- 47924.0 pg/ml) than in patients with septic shock (898.8 pg/ml, range 77.9-5420.0 pg/ml), although this difference did not reach statistical significance (Mann-Whitney test, $p = 0.07$) (Figure 2). Levels of Ang-2, an endothelial barrier-destabilizing factor, were higher in patients that developed septic shock (6494.0 pg/ml, range 1730.0-49611.0 pg/ml) compared to patients with non-complicated sepsis (4467.0 pg/ml, range 1289.0-37318.0 pg/ml; Mann-Whitney test: $p = 0.02$) (Figure 2).

In addition to these findings, serum levels of Ang-1 presented a negative correlation with the SOFA score ($R_s=-0.36$; $p=0.0002$) and serum levels of Ang-2 a positive correlation with CRP ($R_s=0.3$; $p=0.002$).

The Ang-2/Ang-1 ratio is increased in patients FN neutropenia that will develop septic shock compared to patients with non-complicated FN

Because of their antagonistic roles for endothelial barrier integrity, the relative concentrations of Ang-1 and Ang-2, expressed as the Ang-2/Ang1 ratio, has been considered a more relevant sepsis biomarker than isolated levels of each factor. In fact, the Ang-2/Ang-1 ratio was much higher in the septic shock outcome group (5.3, range 0.6-57.1) compared to patients with non-complicated FN (1.9, range 0.1-64.6; Mann-Whitney test: $p=0.01$) (Figure 3).

Estimation of the diagnostic accuracy of the Ang-2/Ang-1 ratio for the development of septic shock yielded an area under the ROC curve of 0.68 (95%CI = 0.55 to 0.81; $P = 0.01$). An Ang-2/Ang-1 ratio of 5.0 was the optimal cut-off value identified by the ROC procedure, with a sensitivity of 60% (95%CI = 36.1% - 80.9%) and a specificity of 77.2% (95% CI = 66.4% to 85.9%) for the development of septic shock. The positive and negative predictive values were 47% and 85% respectively. Of note, the estimated diagnostic accuracy of the Ang-2/Ang-1 ratio was higher than that obtained with either Ang-1 or Ang-2 levels alone, as well as that of CRP or the MASCC score (data not shown).

An Ang-2/Ang-1 ratio above 5.0 independently predicts development of septic shock and sepsis-related mortality in patients with FN

When the Ang-2/Ang-1 was analyzed as a continuous variable in a Cox proportional-hazards model, the relative risk of shock septic was 1.06 (95% CI 1.02-1.10; $P=0.004$), even after adjustment for neutrophil and platelets counts. Other variables, including age, sex, baseline diagnosis, treatment type, CRP, among others, were not found to be useful in the prediction of septic shock development in our population. This first analysis assumed that the association between the Ang-2/Ang-1 ratio and the risk of septic shock development presented

a graded relation. We next evaluated whether there was a threshold level of the Ang-2/Ang-1 ratio above which the risk of shock septic would increase in a non-linear fashion. We dichotomized levels of Ang-2/Ang-1 into median and cut-off values (estimated by the ROC procedure), and calculated the relative risks of septic shock development. The risk of shock septic was almost five times greater among patients with Ang-2/Ang-1 ratio exceeding the cut-off, even after adjustment for neutrophil and platelet counts (covariates with a $P < 0.1$ in univariate analysis) (Table 2).

Ang-2/Ang-1 ratio and 28-day sepsis-related mortality in patients with FN

The relative risk of sepsis-related mortality for patients with Ang-2/Ang-1 levels above the 5.0 cut-off was 5.8 (95%CI 1.96 to 17.59; $P=0.001$) and 2.74 (95% confidence interval, 1.054 to 7.160; $P=0.03$) for Ang-2/Ang-1 levels above the median. Using a Cox Proportional-hazards model, adjusting for neutrophil and platelet count, the mortality risk was 4.20 (95%CI 1.60 to 11.05; $p=0.004$) for patients with an Ang-2/Ang-1 ratio above 5.0, and 2.73 (95%CI 0.97 to 7.75; $P=0.059$) for patients with an Ang-2/Ang-1 ratio above the median. The Kaplan-Meier curves showed clear divergence of survival estimates between patients with Ang-2/Ang-1 ratios above or below the median or cut-off values (Fig.4).

DISCUSSION

Among the several factors that contribute to a higher risk of sepsis complications in patients with cancer, chemotherapy-associated neutropenia is probably the single-most important one [24]. Although the risk is higher in patients with severe and long-lasting neutropenia, risk stratifications tools are limited, and the vast majority of patients end up treated aggressively with hospitalization and broad-spectrum antibiotics for several days [24]. The most accepted risk stratification tool for cancer-related FN is the MASCC score [22]. However, this score offers very limited information for patients categorized as high-risk (MASCC ≤ 21), which encompasses most patients submitted to more intensive myelotoxic chemotherapy protocols. Accordingly, management of patients with cancer-related

FN remains a challenging situation, for which the availability of informative biomarkers would be welcome.

In the last decade, mechanisms by which the endothelial barrier is established and maintained in the embryo have been described in detail [6]. As they were being described, some authors demonstrated that the same mechanisms were involved in the pathological disruption of the endothelial barrier observed during sepsis [7]. Soon after that, encouraging results were published about the use of VEGF-A, sFlt-1, Ang-1 and Ang-2 as biomarkers of septic shock development in patients with sepsis. In general, these studies demonstrated a consistent pattern in patients with septic shock, characterized by increased levels of proteins that loosen endothelial cell junctions during vessel formation, such as VEGF-A and Ang-2, and decreased levels of barrier stabilizing proteins such as Ang-1. Indeed, imbalances in Ang-1 and Ang-2 ratio, expressed by a high Ang-2/Ang-1 ratio, recently emerged as one of the most promising biomarkers for septic shock development in several populations [8, 14, 25]. However, because patients with cancer were excluded or underrepresented in these studies, it is not known whether these results may be applied to patients with cancer.

In a preliminary study, we demonstrated that VEGF-A, sFlt-1, Ang-1 and Ang-2 were associated with sepsis severity in patients with FN [17, 18]. So, the objective of the present study was to validate the use of these biomarkers in a larger and independent cohort of patients with cancer and chemotherapy-associated FN. However, the validation and demonstration of the clinical utility of a biomarker is a complex and stepwise process [5]. The first step consists in the demonstration of differences in the concentration of a specific biomarker between healthy individuals and patients, or between patient subgroups with different clinical outcomes. This is normally achieved with studies performed under strict experimental conditions, very different from the situations in which the biomarker would be used. This step should always be followed by a validation study, in an independent and statistically sound population, and in a less artificial environment. Hence, our study was deliberately designed to mimic the conditions in which a sepsis biomarker would be ordered. This was achieved by: (1) sequential

enrollment of patients that fulfilled the inclusion criteria during a 12-month study period in two different in-patient units from our Institution; (2) limitation of exclusion criteria; (3) sample collection and initial processing performed by hospital staff, allowing a level of pre-analytic variation similar to what would be expected in clinical practice; and (4) sampling time coincident with the next routine sample collection, mimicking the use of a sepsis biomarker (CRP) that is already in clinical practice in patients with FN [26].

Not infrequently, preliminary results of sepsis biomarkers are not reproduced in validation studies or in clinical practice. In fact, our study did not validate the measurement of VEGF-A or sFlt-1 as informative biomarkers of septic shock, in contrast to previous reports [18, 27]. Several factors could explain this discrepancy: differences in sampling time, increased baseline levels of VEGF-A in certain cancers [28], or the fact that neutrophils and platelets are major sources of these mediators [29]. Whatever the case, our results suggest that assays for VEGF-A and sFlt-1 lack the robustness required for a sepsis biomarkers to overcome the challenge of real-world conditions, and to perform as a clinically useful biomarker in this scenario.

On the other hand, we were able to confirm that the Ang-2/Ang-1 ratio is an independent predictor of septic shock development in patients with cancer and high-risk FN, for whom other risk stratification tools provide very limited information. It should be noted that despite the presence of a significant overlap of values of this ratio between the two outcome groups, its estimated accuracy was actually better to that of CRP or the MASCC score, which are the most widely used risk stratification tools for this population. The fact that our study deliberately reproduced conditions that would be faced by a new sepsis biomarker in clinical practice further strengthens our results.

One of the main objectives of our study was to determine whether Ang-1 and Ang-2 measurements would remain as relevant sepsis biomarker in a population with very different characteristics than those evaluated in previous studies of non-neutropenic patients. Indeed, it was interesting to note that the optimal cut-off of the Ang-2/Ang-1 ratio for the prediction of septic shock in our

population was very similar to the mean peak Ang-2/Ang-1 ratio observed in non-survivors in a study with non-neutropenic sepsis patients (5.0 vs 5.4 respectively) [8]. It should be noted that when compared to patients from non-neutropenic studies, signs of sepsis were milder in our population, as evidenced by a median SOFA score of 4. The reason for this characteristic lies in the fact that patients with FN are instructed to look for medical care immediately after fever onset, which allows earlier enrollment and sample collection in studies like ours. Therefore, the fact that a similar value of the Ang-2/Ang-1 ratio was associated with worse outcomes in these two different populations strengthens the concept that imbalances in Ang-2 and Ang-1 concentrations are indeed a relevant biomarker of septic shock development. Indeed, this concept is reinforced by a series of other recent studies showing that manipulation of angiopoietin pathways can improve sepsis outcomes in different animal models [30-32].

Finally, we believe that an additional use of the Ang-2/Ang-1 ratio in sepsis in the future could be the identification of septic patient subgroups, in whom disruption of the endothelial barrier could play a more prominent pathogenic role. In theory, the identification of these more “leaky” patients could rationally guide the use of new therapeutic strategies targeting pathways involved in endothelial barrier regulation [33, 34]. As targeted-therapies directed to different pathogenic mechanisms of sepsis (e.g. coagulation activation, Toll-like receptors, endothelial barrier regulation) begin to reach the phase of human clinical trials, the availability of biomarkers capable to identify discrete patient subgroups among the highly heterogeneous population of patients with sepsis, could well be the difference between failure and success of new therapies for sepsis [4].

CONCLUSIONS

In conclusion, our study validates the measurement of the Ang-2/Ang-1 ratio as a clinically-relevant biomarker of septic shock development in patients with cancer and chemotherapy-related FN.

KEY MESSAGES

- Ang-1 and Ang-2 are key regulators of endothelial barrier integrity, and seem to be involved in the pathological disruption of endothelial barrier during sepsis.
- Levels of Ang-1 and Ang-2 have been shown to be promising biomarkers of septic shock development in several populations, but not in cancer patients.
- A high Ang-2/Ang-1 is an independent predictor of septic shock development in patients with cancer and chemotherapy-associated febrile neutropenia.

LIST OF ABBREVIATIONS

VEGF: vascular endothelial growth factor; sFlt-1: soluble fms-like tyrosine kinase-1; AAng: angiopoietin; FN: febrile neutropenia; IRB: institutional review board; SOFA: sequential organ failure assessment; MASCC: multinational association for Supportive Care In Cancer; STARD: standards for the reporting of diagnostic accuracy studies; CRP: C-reactive protein; ELISA: enzyme linked immunosorbent assays; ROC: receiver operator characteristics.

COMPETING INTERESTS

The authors declare they have no competing interests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

MMLF enrolled patients, recorded clinical data, performed laboratory analysis and drafted the manuscript; CC, GRS, ACV and FJPA enrolled patients and contributed to manuscript production; IL, JMA and CADS contributed to study design, data analysis and reviewed the manuscript; EVDP designed the study, analyzed the data and contributed to manuscript production.

REFERENCES

1. McMillan DC: **Systemic inflammation, nutritional status and survival in patients with cancer.** *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2009, **12**:223-226.
2. Kumar G, Kumar N, Taneja A, Kaleekal T, Tarima S, McGinley E, Jimenez E, Mohan A, Khan RA, Whittle J *et al*: **Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007).** *Chest*, **140**:1223-1231.
3. Pierrakos C, Vincent JL: **Sepsis biomarkers: a review.** *Critical care (London, England)* 2010, **14**:R15.
4. Moyer MW: **New biomarkers sought for improving sepsis management and care.** *Nat Med* 2012, **18**:999.
5. Sackett DL, Haynes RB: **The architecture of diagnostic research.** *Bmj* 2002, **324**:539-541.
6. Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein BM: **The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications.** *Dev Cell* 2009, **16**:209-221.
7. 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.
8. Ricciuto DR, dos Santos CC, Hawkes M, Toltl LJ, Conroy AL, Rajwans N, Lafferty EI, Cook DJ, Fox-Robichaud A, Kahnnamoui K *et al*: **Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 as clinically informative prognostic biomarkers of morbidity and mortality in severe sepsis.** *Critical care medicine* 2011, **39**:702-710.
9. Paulus P, Jennewein C, Zacharowski K: **Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis?** *Biomarkers* 2011, **16 Suppl 1**:S11-21.
10. Kumpers P, van Meurs M, David S, Molema G, Bijzet J, Lukasz A, Biertz F, Haller H, Zijlstra JG: **Time course of angiopoietin-2 release during**

- experimental human endotoxemia and sepsis.** *Critical care (London, England)* 2009, **13**:R64.
11. 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.
 12. Schuetz P, Jones AE, Aird WC, Shapiro NI: **Endothelial cell activation in emergency department patients with sepsis-related and non-sepsis-related hypotension.** *Shock* 2011, **36**:104-108.
 13. 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**:650-654.
 14. 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.** *Critical care (London, England)* 2008, **12**:R147.
 15. Legrand M, Max A, Peigne V, Mariotte E, Canet E, Debrumetz A, Lemiale V, Seguin A, Darmon M, Schlemmer B *et al*: **Survival in neutropenic patients with severe sepsis or septic shock.** *Critical care medicine* 2012, **40**:43-49.
 16. Andre S, Taboulet P, Elie C, Milpied N, Nahon M, Kierzek G, Billemonet M, Perruche F, Charpentier S, Clement H *et al*: **Febrile neutropenia in French emergency departments: results of a prospective multicentre survey.** *Critical care (London, England)* 2010, **14**:R68.
 17. Alves BE, Montalvao 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.
 18. Alves BE, Montalvao SA, Aranha FJ, Lorand-Metze I, De Souza CA, Annichino-Bizzacchi JM, De Paula EV: **Time-course of sFlt-1 and VEGF-A**

- release in neutropenic patients with sepsis and septic shock: a prospective study.** *J Transl Med* 2011, **9**:23.
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**:730-751.
 20. 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**:1644-1655.
 21. 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 medicine* 1996, **22**:707-710.
 22. 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**:3038-3051.
 23. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, Lijmer JG, Moher D, Rennie D, de Vet HC: **Toward complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy. The STARD initiative.** *Am J Clin Pathol* 2003, **119**:18-22.
 24. Klastersky J, Awada A, Paesmans M, Aoun M: **Febrile neutropenia: a critical review of the initial management.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2011, **78**:185-194.

25. Carrol ED: **Angiopoietins as prognostic biomarkers and effector molecules in severe sepsis.** *Critical care medicine* 2011, **39**:2203-2204; author reply 2204.
26. Pova P, Souza-Dantas VC, Soares M, Salluh JF: **C-reactive protein in critically ill cancer patients with sepsis: influence of neutropenia.** *Critical care (London, England)* 2011, **15**:R129.
27. Hamalainen S, Juutilainen A, Matinlahti 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.
28. Guo B, Liu Y, Tan X, Cen H: **Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in adult patients with acute myeloid leukemia: a meta-analysis.** *Leukemia & lymphoma* 2012.
29. 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.
30. Alfieri A, Watson JJ, Kammerer RA, Tasab M, Progijs P, Reeves K, Brown NJ, Brookes ZL: **Angiopoietin-1 variant reduces LPS-induced microvascular dysfunction in a murine model of sepsis.** *Critical care (London, England)* 2012, **16**:R182.
31. Kumpers P, Gueler F, David S, Slyke PV, Dumont DJ, Park JK, Bockmeyer CL, Parikh SM, Pavenstadt H, Haller H *et al*: **The synthetic tie2 agonist peptide vasculotide protects against vascular leakage and reduces mortality in murine abdominal sepsis.** *Critical care (London, England)* 2011, **15**:R261.
32. David S, Mukherjee A, Ghosh CC, Yano M, Khankin EV, Wenger JB, Karumanchi SA, Shapiro NI, Parikh SM: **Angiopoietin-2 may contribute to multiple organ dysfunction and death in sepsis*.** *Critical care medicine* 2012, **40**:3034-3041.

33. van Meurs M, Kumpers P, Ligtenberg JJ, Meertens JH, Molema G, Zijlstra JG: **Bench-to-bedside review: Angiopoietin signalling in critical illness - a future target?** *Critical care (London, England)* 2009, **13**:207.
34. Goldenberg NM, Steinberg BE, Slutsky AS, Lee WL: **Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis.** *Sci Transl Med* 2011, **3**:88ps25.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Study flowchart

Figure 2. Vascular permeability-related biomarkers in FN patients.

Serum concentrations of sFlt-1, VEGF-A and angiopoietin (Ang) -1 and Ang-2 in patients with non-complicated FN (n=79) or septic shock (n=20). Mann-Whitney test.

Figure 3. Ang-2/Ang-1 ratio in FN patients.

Ang-2/Ang-1 ratio in patients with non-complicated FN (n=79) or septic shock (n=20). Mann-Whitney test.

Figure 4. 28-day survival of high-risk FN patients

Kaplan-Meier estimates of 28-day survival of patients with FN according to Ang-2/Ang-1 ratio, dichotomized by the median Ang-2/Ang-1 ratio (2.2) in all patients (right panel) or by an optimal cut-off level of 5.0, defined by a ROC analysis.

Table 1. Patient characteristics

	Non-complicated FN (n=79)	Septic (n=20)	shock	P
Gender (male: female)	44:35	12:8		NS**
Age (median,range)	49 (13-78)	52 (21-78)		NS**
Diagnostic				NS**
Acute leukemia	30	10		
Other hematological malignancies	49	10		
Comorbidities (present:absent)	29:40	8:12		NS**
Treatment				NS**
Intensive CTx/autologous HSCT	62	15		
Allogeneic HSCT	17	5		
Neutrophils / μ l (median,range)	80 (0-500)	0 (0-500)		NS*
Platelets $\times 10^9/\mu$ l (median,range)	21,000 (4,000-315,000)	14,500 (3,000-39,000)		NS*
Agent isolation in bloodstream (yes:no)	27:52	7:13		NS**
C reactive protein mg/dl (median,range)	11.20 (0.55-58.30)	12.7 (6.2-40.90)		NS*
SOFA score (median, range)	4 (0-8)	4 (2-14)		p<0,05*
MASCC score (median, range)	19 (12-23)	18 (12-21)		NS*
Time to Shock Septic days (median, range)		3 (1-17)		

CTx: chemotherapy; HSCT: hematopoietic stem cell transplantation; SOFA: sequential organ failure assessment; MASCC: multinational association for supportive care in cancer;

* Mann-Whitney test; ** Fisher's exact test

Table 2. Relative risk of septic shock development

Ang-2/Ang-1 (n=99)	Chi-square test		Multivariate analysis*	
	Odds Ratio (CI 95%)	P	Odds Ratio (CI 95%)	P
<i>>Median</i>	2.90 (1.0 – 8.4)	0.04	2.99 (1.02 – 8.42)	0.045
<i>>Cutoff</i>	5.50 (1.9 - 16)	0.0007	5.47 (1.93-15.53)	0.001

* Binary logistic regression

Anexo 4 – Outras publicações com participação da aluna durante o mestrado

- COLELLA, M. P. ; **FIUSA, M M L** ; ORSI, F. ; PAULA, E. V. ; ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M. . Performance of a point-of-care device in determining prothrombin time in an anticoagulation clinic. Blood Coagulation & Fibrinolysis, v. 23, p. 172-174, 2012.
- Costa-Lima, Carolina ; **Fiusa, Maiara Marx Luz** ; Annichino-Bizzacchi, Joyce M ; Paula, Erich Vinicius de . Prothrombin complex concentrates in warfarin anticoagulation reversal. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (Impresso), v. 34, p. 302-304, 2012.
- HASHIMOTO, V. A. M. ; DE PAULA, E. V. ; COLELLA, M. P. ; **FIUSA, M. M. L.** ; MONTALVAO, S. A. L. ; Machado, F. G. S. ; Orsi, Fernanda A. ; ANNICCHINO-BIZZACCHI, J. M. . Performance of a point-of-care device in determining prothrombin time in supra-therapeutic INRs. International Journal of Laboratory Hematology (Print), v. Epub, p. Early online, 2012.