

**AVALIAÇÃO DE *CELL-FREE DNA* (cfDNA) COMO PREDITOR DE GRAVIDADE EM PACIENTES SÉPTICOS DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CASSIANO ANTÔNIO DE MORAES (HUCAM)**

**Lívia Maria de Araújo Maia Cláudio**

**Dissertação de Mestrado Em Ciências Fisiológicas**

**Programa De Pós-Graduação Em Ciências Fisiológicas**

**Universidade Federal Do Espírito Santo**

**Vitória, Outubro de 2019**



---

Claúdio, Lívia Maria de Araújo Maia, 1979

Avaliação de cell-free DNA (cfDNA) como preditor de gravidade em pacientes sépticos do hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM). Vitória, 2019

xii, 58p., 29,7cm (M.Sc., Ciências Fisiológicas, 2019)

Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientadora: Profª Drª Paula Frizera Vassallo

1. CfDNA 2. Biomarcadores 3. Sepsis 4. Gravidade.

---





*Ao meu melhor amigo Leonardo e minha eterna amiga Milena (in memoriam).*



## **AGRADECIMENTOS**

A Nossa Senhora, que como mãe, me acolheu em minhas orações para que eu pudesse concluir o meu trabalho.

Aos meus filhos, por serem minha inspiração.

Aos meus pais, Geraldo e Izabel, pela educação, valores e princípios morais e religiosos.

A minha querida irmã pela amizade e carinho.

Ao meu sexteto querido, minhas verdadeiras amigas, em especial a Ana Carolina por ser uma grande companheira de trabalho.

A Maria Valéria Magalhães, meu exemplo como médica.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Frizera Vassallo, por ter me aceito como aluna, por ter me ajudado no período do mestrado, não só como orientadora, mas uma amiga.

Ao Prof. Dr. Valério Garrone Barauna, pelas inúmeras contribuições no meu projeto, e por sua disponibilidade constante.

A Dr<sup>a</sup>. Rebeca Caldeira Machado por ser meu braço direito, por ensinar-me desde a coleta de dados até a construção da tese e artigo.

Aos profissionais do HUCAM, técnicos de laboratório, técnicos de enfermagem, enfermeiros e médicos, pois sem eles, minha pesquisa não seria possível.

Aos meus pacientes, que entenderam minha ausência em algumas situações.

Obrigado por tudo.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13.</b>
1.1 EPIDEMIOLOGIA DA SEPSE .....	13.
1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE .....	15.
1.3 DIAGNÓSTICO DA SEPSE.....	19.
1.4 BIOMARCADORES.....	21.
<b>1.4.1 Cell free DNA</b> .....	<b>22.</b>
<b>1.4.1.2 Cell free DNA e sepse</b> .....	<b>25.</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>29.</b>
2.1 OBJETIVOS PRIMÁRIOS.....	29.
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29.
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>30.</b>
3.1 CASUÍSTICA .....	30.
<b>3.1.2 Critérios de inclusão</b> .....	<b>31.</b>
<b>3.1.3 Critérios de exclusão</b> .....	<b>31.</b>
3.2 COLETA E ANÁLISE DE DADOS .....	31.
<b>3.2.1 Dados clínicos</b> .....	<b>29.</b>
<b>3.2.2 Coleta de material biológico</b> .....	<b>32.</b>
<b>3.2.3 Dados laboratoriais preconizados pelo protocolo</b> .....	<b>32.</b>
<b>3.2.4 Quantificação de cell free DNA</b> .....	<b>32.</b>
<b>4 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>33.</b>
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>34.</b>
5.1 VALOR PROGNÓSTICO DO CELL FREE DNA.....	36.
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>41.</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>49.</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>51.</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: SOFA score ( Sequential Organ Failure Assessment ).....	31
Tabela 2: Perfil demográfico e clínico dos pacientes.....	35
Tabela 3: Características bioquímicas de acordo com a gravidade de infecção.....	36
Tabela 4: Regressão Logística Binária entre as variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais e gravidade.....	39
Tabela 5: Regressão Logística Binária entre cfDNA, SOFA e internação em UTI para gravidade.....	40

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Interações importantes para determinar o curso clínico a longo prazo de um paciente após sepse.....	15
Figura 2: Fisiopatologia da sepse.....	16
Figura 3: : Origens de cfDNA no corpo humano.....	25
Figura 4: Concentrações de cfDNA (ng/ml) e gravidade.....	37
Figura 5: Concentrações de CF-DNA (ng/ml) em pacientes sobreviventes e não sobreviventes.....	37
Figura 6: Concentrações de cfDNA (ng/ml) em pacientes com infecção e desfecho.....	38
Figura 7: Curva ROC (Receiver-operating characteristic curves) para gravidade.....	41

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ACCP- American College of Chest Physicians  
APACHE II- Acute Physiology and Chronic Health Evaluation  
ARDS- síndrome do desconforto respiratório agudo  
AUC- áreas sob a curva  
BASES- Brazilian Sepsis Epidemiological Study  
C5a- fragmento de complement 5a  
CD4- grupo de diferenciação 4  
Cf-DNA- cell free DNA  
CO<sub>2</sub>- gás carbônico  
DAMPs- padrões moleculares associados a danos  
DM- diabetes mellitus  
DNA-ácido desoxidorribonucléico  
ESICM- European Society of Intensive Care Medicine  
FC- frequência cardíaca  
FiO<sub>2</sub>- fração de oxigênio  
FR- frequência respiratória  
HAS- hipertensão arterial sistêmica  
HMGB 1- proteína B1 do grupo de alta mobilidade  
IC- intervalo de confiança  
IL- interleucina  
IL 1 $\beta$ - interleucina 1 beta  
IL-10- interleucina 10  
IL-4- interleucina 4  
IL-6- interleucina 6  
IL-8- interleucina 8  
IL-10- interleucina 10  
IL-27-interleucina 27  
ILAS- Instituto Latino Americano de Sepse  
INR- International Normalized Ratio  
IQR- intervalo interquartil  
LR- likelihood ratio negativo

LR+- likelihood ratio positivo

MIF- fator inibidor da migração

MODS- Multiple Organ Dysfunction

NETs- Neutrophil Extracellular Traps

PaCO<sub>2</sub>- pressão parcial de CO<sub>2</sub>

PAF- , fator de ativação plaquetária

PAM- pressão arterial média

PAMPs- padrões moleculares associados a patógenos

PCR- proteína C reativa

PCR- reação em cadeia polimerase

PCT- pró-calcitonina

PO<sub>2</sub>- pressão parcial de oxigenio

PPR- receptores de imunidade inata reconhecedores de padrões

PROGRESS- Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis

PTTK- tempo de tromboplastina parcial ativado

qSOFA- quick SOFA

ROC- receiver operator characteristic

SAPS- Simplified Acute Physiology Change

SCCM- Society of Critical Care Medicine

SIRS- Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

SNP- polimorfismos de nucleotídeo único

SOFA- Sequential Organ Failure Assessment

SPREAD- Sepsis PREvalence Assessment Database

SuPAR- urokinase plasminogen activator receptor

TAP- tempo de atividade da protrombina

TCD4- linfócitos TCD4

TH 1- células T auxiliares do tipo 1

TH 2- células T auxiliares do tipo 2

TNF  $\alpha$ - fator de necrose tumoral alfa

TREM-1- Triggering receptor expressed on myeloid cells

UTI- unidade de terapia intensiva

VPN- valor preditivo negativo

VPP- valor preditivo positivo

## RESUMO

**Introdução:** Sepsé é uma resposta sistêmica do organismo à uma infecção microbiana. Estima-se que ocorram 19 milhões de casos em todo o mundo por ano com elevadas taxas de letalidade, sendo considerada um grave problema de saúde pública. O diagnóstico da sepsé permanece como um grande desafio para profissionais da área da saúde, e até o momento, não há nenhum padrão ouro para o diagnóstico de sepsé. Novos biomarcadores, como o cfDNA, sendo estudados em sepsé para melhorar o diagnóstico e permitir intervenção terapêutica precoce. **Objetivo:** Investigar o valor do cfDNA como preditor de gravidade em pacientes sépticos e sua associação com o escore de disfunção orgânica. **Métodos:** 124 pacientes, que tiveram o protocolo de sepsé iniciado, foram divididos em infecção (n=37) e sepsé / choque séptico (n=87). Dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos de prontuário. As amostras de sangue foram coletadas no momento do diagnóstico e as concentrações de cfDNA foram medidas pela técnica de fluorescência direta. Os resultados foram apresentados em ng/ml. **Resultados:** As concentrações de cfDNA foram maiores de acordo com a gravidade da doença. Valores de cfDNA mais elevados ( $p<0,01$ ) foram observadas em pacientes com sepsé e choque séptico (mediana 186,2; ng/ml, IQR 117,1-363,5) em comparação com pacientes com infecção (mediana 113,5 ng/ml; IQR 66,1-210,3). Pacientes com infecção (n=37) que evoluíram para sepsé/choque séptico (n=13) apresentaram maiores concentrações de cfDNA (mediana 212 ng/ml; IQR 7.18-270.3) em comparação com pacientes que não evoluíram para disfunção orgânica, ou seja, sepsé (mediana 100,3 ng/ml; IQR 59,35-186,5),  $p=0,012$ . Na análise de regressão multivariada, apenas a concentração de cfDNA (IC95% 1,002-1,012,  $p<0,01$ ) e o escore SOFA (IC95% 1.579-3.730,  $p<0,01$ ) foram fortes e significativos preditores de gravidade. Pela análise ROC, o cfDNA plasmático teve menos poder discriminativo (AUC 0,69, IC 95% 0,63-0,79) que o escore SOFA para prever a gravidade da infecção (AUC 0,88, IC 95% 0,82-0,94). **Conclusão:** O cfDNA foi um preditor independente de gravidade em pacientes sépticos, porém com poder discriminatório inferior ao SOFA, escore clínico utilizado na prática clínica.

Palavras chave: 1. cfDNA 2. Biomarcadores 3. Sepsé 4. Gravidade.

## ABSTRACT

**Introduction:** Sepsis is a systemic response of the body to a microbial infection. It is estimated that 19 million cases worldwide occur each year with high case fatality rates and is considered a serious public health problem. Diagnosing sepsis remains a major challenge for healthcare professionals, and so far, there is no gold standard for diagnosing sepsis. New biomarkers, such as cfDNA, have been studied in sepsis to improve diagnosis and allow early therapeutic intervention. **Objective:** To investigate the value of cfDNA as a predictor of severity in septic patients and its association with organ dysfunction score. **Methods:** 124 patients who had the sepsis protocol started were divided into infection (n=37) and sepsis/septic shock (n=87). Clinical and epidemiological data were obtained from medical records. Blood samples were collected at diagnosis and cfDNA concentrations were measured by the direct fluorescence technique. Results were presented in ng/ml. **Results:** cfDNA concentrations were higher according to disease severity. Higher cfDNA values ( $p<0.01$ ) were observed in patients with sepsis and septic shock (median 186.2; ng/ml, IQR 117.1-363.5) compared with patients with infection (median 113.5 ng/ml; IQR 66.1-210.3). Infected patients (n=37) who progressed to sepsis/septic shock (n = 13) had higher cfDNA concentrations (median 212 ng/ml; IQR 7.18-270.3) compared to patients who did not progress to organ dysfunction (median 100.3 ng/ml; IQR 59.35-186.5),  $p=0.012$ . In multivariate regression analysis, only cfDNA concentration (95% CI 1.002-1.012,  $p<0.01$ ) and SOFA score (95% CI 1.579-3.730,  $p<0.01$ ) were strong and significant predictors of severity. By ROC analysis, plasma cfDNA had less discriminative power (AUC 0.69, 95% CI 0.63-0.79) than the SOFA score to predict the severity of infection (AUC 0.88, 95% CI 0.82-0.94). **Conclusion:** cfDNA was an independent predictor of severity in septic patients, but with lower discriminatory power than SOFA, the clinical score used in clinical practice.

Keywords: 1. cfDNA 2. Biomarkers 3. Sepsis 4. Severity.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 EPIDEMIOLOGIA DA SEPSE

A sepse é definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro frente a uma infecção. (Singer et al, 2016). Conforme o Terceiro Consenso Internacional para definições de sepse (Sepsis-3, 2016), a sepse passou a ser classificada em: infecção, sepse e choque séptico. A infecção é o quadro mais brando da doença, enquanto na sepse, o paciente apresenta disfunção de órgão (respiratória, hepática, circulatória, neurologia, renal ou plaquetária). O choque séptico, quadro mais grave da sepse, é caracterizado por agravamento da disfunção orgânica com elevado prejuízo na perfusão de tecidos e disfunção hemodinâmica (Shankar-Hari et al, 2016).

A sepse é uma grande preocupação de saúde pública, sendo responsável por mais de US\$ 24 bilhões (5,2%) do total de custos hospitalares nos EUA em 2011 (Torio et al, 2015). No Brasil, estima-se um gasto em torno de 600 a 1200 dólares por paciente (Instituto Latino-Americano de Sepse -ILAS, 2016). Além do elevado custo, a incidência de sepse está aumentando a cada ano, provavelmente refletindo o envelhecimento de populações com maiores comorbidades, infecção por agentes resistentes a diferentes tipos de antimicrobianos e melhorias no diagnóstico deste quadro (Iwashyna et al, 2012; Galeski et al, 2013). A incidência da sepse varia entre diferentes grupos étnicos e raciais (Martin et al, 2003), com idosos (idade >65 anos) representando 60 a 85 % dos casos (Kaukonen et al, 2014).

Estima-se que ocorram 31 milhões de casos em todo o mundo por ano, levando potencialmente a 6 milhões de mortes (Organização Mundial da Saúde, 2017). No Brasil, os aspectos epidemiológicos da sepse têm sido investigados, destacando-se o '*BASES Study*' (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*), estudo multicêntrico e observacional realizado em instituições públicas e privadas, identificando incidência de sepse de 57,9 por 1000 pacientes-dia. O

estudo SPREAD (*Sepsis PREvalence Assessment Database*), publicado em 2017 revelou que a incidência de sepse em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTIs) brasileiras é em torno de 420.000 casos por ano, dos quais 230.000 morrem no hospital.

Sepse é considerada a principal causa de morte em UTIs não cardiológicas (Vicent et al, 1995) com elevadas taxas de letalidade que variam de acordo com as características socioeconômicas do país. Países desenvolvidos, como Austrália e Nova Zelândia, apresentaram letalidade de sepse grave em torno 18% (Kaukonen et al, 2014). No Brasil, dados do último relatório de 2018 do ILAS mostram que a letalidade por sepse e choque séptico ainda é muito elevada, atingindo, respectivamente 31,2% e 64,5% nos hospitais públicos brasileiros, com resultados um pouco melhores de 17,1% e 52,7% respectivamente em hospitais privados (ILAS, 2018). O estudo PROGRESS (*Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis*), por exemplo, em que fizeram parte sete UTIs nacionais, revelou taxas de letalidade maiores para sepse e choque séptico (56%) quando comparado com outros países em desenvolvimento (45%) e desenvolvidos (30%).

Apesar da gravidade, a letalidade da sepse em países desenvolvidos vem diminuindo ao longo dos anos de forma progressiva. Dentre as razões que podem contribuir para este processo de redução estão as melhorias no processo de cuidado dos pacientes sépticos, devido aos avanços nos critérios diagnósticos e na abordagem terapêutica. (Kaukonen et al, 2014; Elizabeth et al, 2014; Iwashyna et al, 2014).

Com a redução da letalidade, o número de sobreviventes a esta doença é crescente (figura 1), e estes sobreviventes podem apresentar sequelas devido à sepse. Em curto prazo, os sobreviventes à sepse são readmitidos em maior frequência em até 90 dias pós-alta hospitalar, devido à ocorrência de infecções, insuficiência renal aguda, insuficiência respiratória aguda e pneumonia por aspiração (Prescott et al, 2015). Em 180 dias da alta hospitalar estes sobreviventes já apresentam maior letalidade (Goodwin et al, 2015), e no ano seguinte à alta utilizam mais os serviços de saúde, em relação aos não

acometidos pela sepse (Prescott et al, 2014). De fato, há uma crescente conscientização de que pacientes que sobrevivem à sepse geralmente têm deficiências físicas, psicológicas e cognitivas a longo prazo, com significativo impacto em relação aos cuidados de saúde e implicações sociais (Iwashyna et al, 2012)(figura 1).

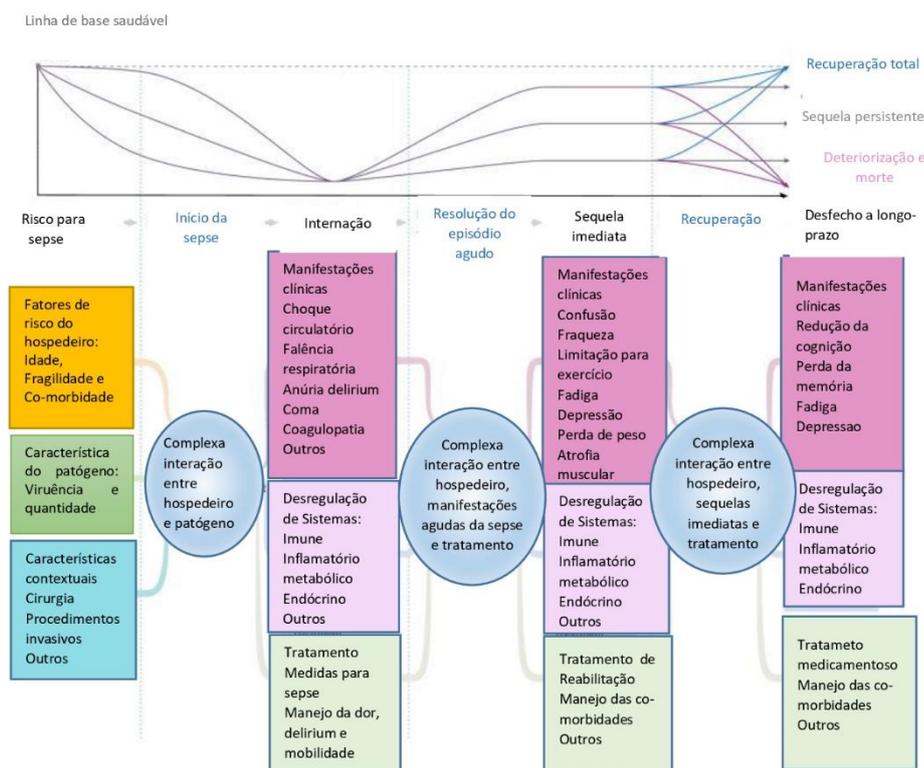


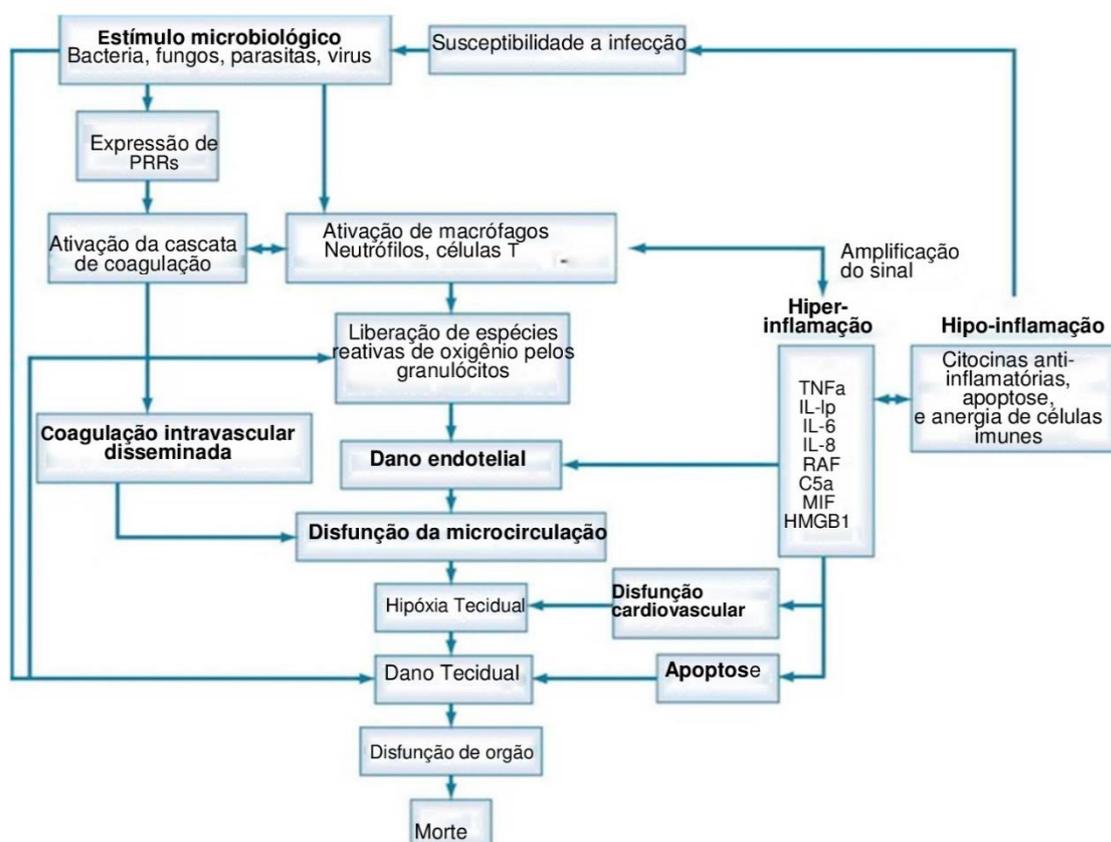
Figura 1: **Interações importantes para determinar o curso clínico a longo prazo de um paciente após sepse.** Existem muitos cursos clínicos que um paciente pode seguir após uma hospitalização por sepse, desde a rápida e completa recuperação até complicações recorrentes e morte. Adaptado de Prescott et al, 2018.

## 1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

A sepse é uma síndrome heterogênea, de início fundamentalmente pró-inflamatório, causada pela resposta desbalanceada do sistema imune inato do hospedeiro frente a uma infecção, resultando em disfunção de órgãos (Hotchkiss et al, 2016). As principais variáveis fisiopatológicas determinantes no desenvolvimento da sepse são as características do agente infectante

(carga e virulência) e do hospedeiro, tais como: fatores ambientais, genéticos, estado imunológico e comorbidades (Angus et al 2013; Russel et al, 2013).

A sepse é caracterizada por liberação de fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, que culminam com disfunção endotelial, comprometendo o sistema cardiocirculatório e a homeostase intracelular. Hipóxia celular e apoptose contribuem para a disfunção orgânica e morte (figura 2).



**Figura 2: Fisiopatologia da sepse.** HMGB, proteína do grupo B de alta mobilidade; IL, interleucina; MIF, fator inibidor da migração; PAF, fator de ativação plaquetária; TNF, fator de necrose tumoral, PRRs, receptores da imunidade inata reconhecedores de padrões. Adaptado de Konrad et al, 2015.

Por definição, a infecção é parte fundamental da fisiopatologia da sepse. Bactérias, bem como fungos, parasitas ou vírus, podem desencadear os mecanismos que levam à sepse. Inicialmente agentes infecciosos ativam o sistema imune inato através da ação dos receptores de imunidade inata reconhecedores de padrões (PRRs), reconhecem padrões moleculares

associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Os PAMPs estão em componentes estruturais dos agentes infecciosos, já os DAMPs em moléculas liberadas por células do hospedeiro danificadas em resposta aos agentes infecciosos (Tang et al, 2012).

Em consequência à ativação dos PRRs, os macrófagos e células T CD4, liberam primeiramente o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e a interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ). Esses mediadores primários induzem a liberação de vários mediadores secundários que amplificam a inflamação, dentre eles o fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), proteína do grupo 1 de alta mobilidade (HMGB1), fator de agregação plaquetária (PAF), e outras interleucinas como a IL-6 e IL-8. Um passo importante na amplificação do sinal é a ativação do sistema de complemento. Além de ser ativado por complexos antígeno-anticorpo, o sistema complemento pode ser estimulado pela endotoxina bacteriana. O fragmento de complemento C5a, um produto de clivagem da cascata de complemento, estimula os macrófagos a produzirem mais mediadores pró-inflamatórios. A liberação de todos os fatores citados, resultam em ativação de neutrófilos, linfócitos e do endotélio vascular (Konrad et al, 2015).

A resposta imune na sepse não envolve apenas mediadores pró-inflamatórios. Como em muitos outros processos fisiológicos, o organismo produz inibidores para controlar certas reações. Os mediadores pró-inflamatórios são neutralizados por moléculas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10, porque as células T CD4 podem mudar da produção de citocinas inflamatórias (células T auxiliares do tipo 1 [TH1]) para a produção de citocinas anti-inflamatórias (células T auxiliares do tipo 2) [TH2] (Juan et al, 2017).

As citocinas inflamatórias participam da ativação do endotélio vascular, que passa a expressar maior quantidade de moléculas de adesão, promovem aumento da permeabilidade vascular, ambos com a finalidade de facilitar a entrada de outras células inflamatórias e de linfócitos da resposta adaptativa, para o local da infecção, bem como, vasodilatação por meio da liberação de óxido nítrico pelas células endoteliais (Henkins et al, 2009). Além dos

importantes efeitos locais, algumas citocinas inflamatórias possuem efeitos sistêmicos atuando nos hepatócitos, os quais sintetizam e secretam proteínas de fase aguda, tais como proteína C reativa (PCR) e pró-calcitonina (PCT), capazes de se ligarem a diversos patógenos e de ativarem o complemento (Rodrigo S B, 2011). Além da inflamação, na resposta de defesa à infecção, há ativação da cascata de coagulação, bem como redução dos fatores anticoagulantes (Henkins et al, 2009).

Além da resposta sistêmica imunológica à infecção e alterações na atividade dos diversos mediadores da inflamação, ocorrem alterações na coagulação e no metabolismo celular e disfunção em múltiplos órgãos (Calvano et al, 2005). A liberação sistêmica de citocinas inflamatórias provoca vasodilatação, que leva à queda importante da pressão arterial juntamente com aumento da permeabilidade vascular, e conseqüentemente, redução do volume sanguíneo circulante levando ao choque séptico e insuficiência de múltiplos órgãos. Neste, a liberação massiva de TNF-alfa ativa a coagulação intravascular disseminada com formação de trombos na microcirculação, a qual consome extensivamente fatores de coagulação, com conseqüente hemorragia, queda da pressão arterial, provocando falha na perfusão sanguínea de órgãos vitais, tais como rins, coração e pulmões. A falha na perfusão sanguínea culmina em oferta inadequada de oxigênio aos tecidos, contribui para o aumento do metabolismo anaeróbico e a hiperlactatemia, e é considerada fator chave na falência de órgãos (Henkins et al. 2009). A resposta inflamatória sistêmica, ainda pode provocar disfunção endotelial, juntamente com morte celular e dano mitocondrial causado por estresse oxidativo e hipoxemia citopática (Goldenberg et al, 2011; Galley et al, 2011) (figura 2).

Outro fator de eliminação do patógeno, associada à resposta inflamatória, é o *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) liberado por neutrófilos e células fagocitárias e que tem um papel central na defesa imune. Os NETs são fibras de cromatina liberadas por neutrófilos revestidas por proteases (incluindo elastase) e outras moléculas antimicrobianas (como as histonas), e que podem ser tóxicas para a célula hospedeira (Phillipson et al, 2011). A liberação de NETs pode acontecer em três formas: através de um mecanismo vesicular;

podem ser liberadas por meio da lise celular. As NETs também podem ser liberadas pelas mitocôndrias, mas o processo ainda permanece pouco definido na literatura (Pilszczek et al, 2010; Marcos et al, 2010).

Explicar o motivo da inflamação generalizar-se em alguns pacientes, e permanecer localizada em outros, tem sido alvo de alguns estudos em pacientes sépticos. Variantes genéticas de citocinas podem desempenhar um papel nessa questão. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*) são variações pontuais encontradas ao longo do DNA, que afeta somente uma base (adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G)) na sequência do genoma entre indivíduos de uma espécie ou entre pares de cromossomos de um indivíduo. Os SNPs de algumas citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 e CD14, foram associados a uma pior evolução no choque séptico ou a um risco aumentado de desenvolver sepse (Gao et al, 2015; Georgescu et al, 2017). No entanto, os resultados desses estudos ainda são difíceis de interpretar devido a achados contraditórios e diferenças nas populações estudadas e suas etnias.

Grandes avanços têm ocorrido permitindo maior sobrevida para os pacientes com sepse, porém, uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos é importante para interrupção na sequência de eventos que estão relacionados à sua patogênese, contribuindo para a redução da alta morbimortalidade evidenciado em diferentes estudos.

### 1.3 DIAGNÓSTICO DE SEPSE

O diagnóstico da sepse permanece como um grande desafio para profissionais da área da saúde porque sua identificação, quando não realizada precocemente poderá resultar em falência de órgãos e evolução para óbito.

Desde 1992, o diagnóstico de sepse baseava-se na Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) associada à disfunção de órgãos. A SIRS avalia os seguintes parâmetros: temperatura corporal  $> 38^{\circ}$  (hipertemia) ou  $< 36^{\circ}$  (hipotermia); frequência respiratória (FR)  $> 20$  incursões respiratórias/minuto (taquipnéia) ou uma pressão parcial de CO<sub>2</sub> (PaCO<sub>2</sub>)  $< 32$

mmHg; frequência cardíaca (FC) > 90 batimentos cardíacos/minuto; aumento ou redução do número de leucócitos no sangue periférico (>12.000 ou <4.000 células/mm<sup>3</sup>) ou presença de mais de 10% de leucócitos jovens (bastões). Em paciente com suspeita de infecção, a associação de dois destes parâmetros e uma disfunção orgânica, definia a sepse. Esta classificação tinha a característica de ser muito sensível para o diagnóstico desta síndrome (Bone et al, 1992).

Com o objetivo de melhorar a especificidade no diagnóstico de sepse, em 2016, a *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) e a *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM) publicaram novas definições baseadas em uma análise bastante robusta de grandes bancos de dados, basicamente americanos. Desta forma, os critérios de SIRS (Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica) na classificação atual passam a não ser mais requeridos para o diagnóstico de sepse e houve modificações para definir a presença de disfunção orgânica. Anteriormente, apenas uma disfunção orgânica definia a presença de sepse. Pelos novos critérios, definiu-se como disfunção orgânica o aumento em pelo menos 2 pontos no escore do *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) basal, em consequência da infecção. Esse novo critério baseou-se na identificação de uma curva ROC (Receiver Operator Characteristic) mais acurada para essa variação de SOFA do que a da presença de SIRS (Seymour et al, 2016) para o diagnóstico de sepse. Também houve modificação na definição de choque séptico, agora conceituado como presença de hipotensão arterial com necessidade de administração de vasopressores para manter pressão arterial média  $\geq 65$  mmHg associada a lactato  $\geq 2$  mmol/L, após adequada reposição volêmica (Shankar-Hari et al, 2016). Uma nova nomenclatura surgiu na classificação de sepse, anteriormente classificada como sepse, sepse grave e choque séptico, sendo extinto o termo “sepse grave”, adotando-se somente sepse. Hoje, classificamos a sepse em: infecção, sepse e choque séptico.

Adicionalmente, foi sugerido utilizar um escore simplificado, denominado “*quick SOFA*” (qSOFA), para identificar rapidamente pacientes adultos com maior probabilidade de ter desfechos clínicos desfavoráveis à beira do leito.

Esse novo escore avalia a frequência respiratória ( $\geq 20$ ), pressão arterial sistólica ( $\leq 100$  mmHg) e nível de consciência (alterado ou normal) (Seymour et al, 2016).

Vale ressaltar, que as novas definições foram propostas para melhorar a especificidade diagnóstica em países desenvolvidos, o que não podemos transpor para países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, visto que ainda subdiagnosticamos a sepse. Conforme Machado et al (2017), trabalho realizado com representantes do ILAS no Brasil, o uso do escore SOFA como definição de disfunção orgânica deve se restringir aos estudos clínicos e epidemiológicos, não sendo utilizado para definir início de tratamento.

Até o momento, não há nenhum padrão ouro para o diagnóstico de sepse; nenhuma ferramenta confiável para avaliar, selecionar e escalonar tratamento, assim como atribuir perfis de risco ou prever resultado. Biomarcadores tem sido alvo de estudos na sepse, tanto para estabelecer diagnóstico, como prognóstico desta doença com complexa fisiopatologia.

#### 1.4 BIOMARCADORES

Existem várias definições mais precisas de biomarcadores na literatura e, que felizmente, se sobrepõem consideravelmente. Biomarcadores são moléculas ou variáveis biofísicas que podem ser medidos diretamente e que indicam a ocorrência de função normal ou anormal de um órgão ou sistema ou ainda uma resposta a um agente farmacológico. Um biomarcador ideal deveria possuir as seguintes propriedades: alta sensibilidade e especificidade, detecção precoce, níveis mais elevados conforme gravidade da doença, baixo custo e fácil realização. Além de permitir um diagnóstico precoce nos pacientes com sepse, deveria também ser um direcionador para intervenções terapêuticas. (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Na prática os biomarcadores mais relevantes em investigação médica são os marcadores bioquímicos que podem ser obtidos com relativa facilidade a partir de fluidos corporais como sangue, urina ou saliva.

De acordo com a revisão de Dupuy et al, na prática clínica, dois tipos de biomarcadores podem ser identificados: os utilizados independentes de terapia (marcadores de diagnóstico ou prognóstico), e aqueles utilizados como adjuvantes para o tratamento (identificar indivíduos que se beneficiam de um tratamento específico, ou prever a eficácia ou toxicidade de um tratamento). Em ambas condições, a pesquisa de biomarcadores novos e mais precisos na sepse se faz necessária (Dupuy et al, 2013).

Na sepse, o reconhecimento do diagnóstico precoce, severidade da síndrome sistêmica, bem como uma melhor estratificação dos pacientes com quadros mais críticos, são de grande importância. Portanto, a busca por um biomarcador ideal que possa ser usado com facilidade para confirmar presença de infecção e sepse, tal como a troponina no diagnóstico de injúria miocárdica, tem sido alvo de pesquisas em todo o mundo. Neste contexto, a descoberta de novos biomarcadores laboratoriais e escores clínicos para o diagnóstico precoce da doença séptica é de notável significância clínica (Marshall et al, 2009). Nos últimos 10 anos, quase 5000 artigos sobre biomarcadores de sepse foram publicados, sendo que antes de 2007 o número total de artigos foi inferior a 3000 (Tjitske et al, 2017).

Em 2010, Pierrakos e Vincent estimaram existir, pelo menos, 178 biomarcadores de sepse já relatados na literatura, porém a grande maioria tinha pouca utilidade na prática clínica. Esses autores selecionaram um grupo de biomarcadores promissores na sepse, dentre eles: TREM-1 (*Triggering receptor expressed on myeloid cells*), IL-27 (interleucina 27), suPAR (*urokinase plasminogen activator receptor*), CD64 (expresso em neutrófilos e macrófagos), presepsina (fragmentos de CD14), microRNAs e *cell-free DNA* (cfDNA) (Pierrakos et al, 2010).

Os biomarcadores disponíveis mais utilizados na rotina médica, PCR, PCT e lactato, possuem limitada especificidade e sensibilidade (Chan e Gu, 2011; Pierrakos and Vincent, 2010). Portanto, na falta de um padrão ouro para o diagnóstico da sepse, há uma necessidade premente de desenvolvimento de

biomarcadores capazes de diagnosticar precisamente a sepse, bem como, identificar seu estágio e gravidade.

#### 1.4.1 *Cell free DNA (cfDNA)*

O DNA livre de células (cfDNA) é constituído por fragmentos de DNA liberados de várias células, incluindo neutrófilos, eosinófilos e macrófagos como resultado da apoptose ou de outras formas de dano a estas células. Trata-se de uma molécula de cadeia dupla altamente fragmentada, medindo aproximadamente 18 a 10000 bp (pares de bases) de comprimento. Este comprimento corresponde ao tamanho do DNA no nucleossoma, unidade primária para organização de DNA no núcleo da célula (Snyder et al, 2016, Karachaliou et al, 2017). Apoptose e necrose não são os únicos mecanismos responsáveis pela presença de cfDNA circulante. Parece que os linfócitos e outros tipos de células, como neurônios, adipócitos e músculos liberam espontaneamente cfDNA recém-sintetizado (Stroun et al, 2001, Van der Varrt et al, 2007) (figura 3); isso pode indicar um papel do cfDNA no funcionamento normal das células ou seu envolvimento na intercomunicação ativa entre as células através da liberação de ácidos nucleicos como uma via de sinalização intercelular, com implicações importantes no funcionamento de neurônios (Anatoli et al, 2019). Evidências recentes indicam um tráfego ativo de cfDNA entre células através de mecanismos transportadores na membrana celular durante o desenvolvimento, remodelação epigenética e regeneração tecidual, principalmente nas células do sistema imunológico adaptativo (Gardiner et al, 2015).

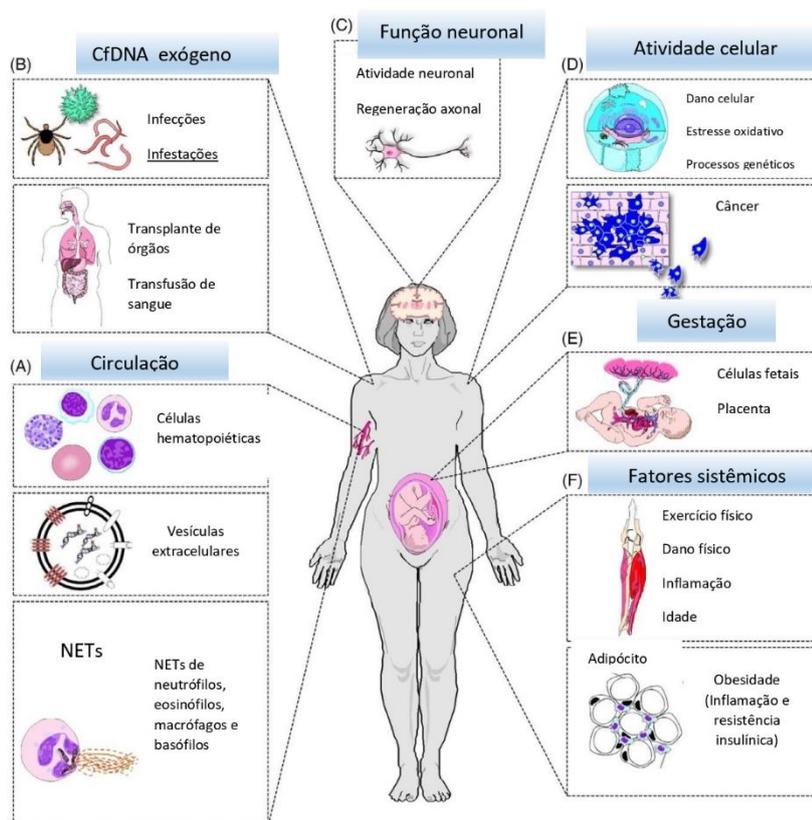
Nos últimos anos, cfDNA vem sendo estudado como um biomarcador em diversas áreas, sendo encontrado em diferentes fluidos corporais, tanto em indivíduos saudáveis quanto em doentes (Janine et al, 2018 ) (figura 3). Mesmo que o cfDNA plasmático seja o mais bem caracterizado, o cfDNA também pode ser encontrado em outros líquidos, como urina (Jahr et al, 2001, Stroun et al, 2001). O desenvolvimento de novas técnicas moleculares está promovendo o estudo e a identificação do cfDNA como um biomarcador minimamente invasivo, com o objetivo de auxiliar no monitoramento da doença, na decisão

clínica e no desfecho do paciente. Uma das maiores descobertas para aplicação do cfDNA foi a identificação de cfDNA fetal no sangue materno (Lo et al, 1989), o que proporcionou o desenvolvimento de testes genéticos no pré-natal. Um estudo multicêntrico nos EUA para triagem pré-natal de aneuploidia fetal, testes utilizando cfDNA tiveram menor taxa de falso positivo na detecção de trissomia do 21 e 18, comparado ao procedimento padrão (Bianchi et al, 2014). Atualmente, uso de cfDNA já está bem estabelecido para avaliação do sexo fetal, teste de paternidade e detecção de aneuploidias e trissomias. O cfDNA já causou um enorme impacto na medicina pré-natal e pode se tornar, no futuro próximo, uma excelente ferramenta na oncologia, medicina de transplante, doenças cardiovasculares e sepse.

A presença de cfDNA no plasma foi descoberta em 1948 por Mandel e Metais (Mandel et al, 1948). Em 1969, Bruno Mondovi e colaboradores evidenciaram que o cfDNA derivado de células neoplásicas poderia estar envolvido com metástases. Em 1977, Leon e colaboradores demonstraram, através de técnica de radioimunoensaio, que metade dos pacientes com câncer tinham níveis significativamente mais altos de cfDNA comparado com os controles.

Outra importante aplicação do cfDNA está relacionada ao acompanhamento de transplantados (transplante de órgãos sólidos). A liberação de cfDNA na corrente sanguínea é, na maiorias das vezes, resultado de morte celular. Então a presença de cfDNA do doador no sangue do receptor poderia ser um marcador de rejeição ( Beck et al, 2015).

Foram relatadas concentrações elevadas de cfDNA no plasma e soro de pacientes com acidente vascular cerebral, trauma, infarto do miocárdio e diversos tipos de câncer, sugerindo a hipótese de que o cfDNA possa estar intimamente relacionado com a inflamação e sua liberação parece ativar citocinas pró-inflamatórias, resultando em necrose e morte celular (Butt et al, 2008).



**Figura 3: Origens de cfDNA no corpo humano.** As fontes de cfDNA e ou causas de liberação de DNA na circulação podem incluir: (A) estruturas celulares na circulação que contêm ou liberam DNA durante atividade normal, dano ou morte; (B) DNA exógeno que entrou no corpo através da digestão de fontes alimentares, transplante ou transfusão, infecção ou infestação; (C) liberação de DNA no sistema nervoso modulado por funções neurológicas; (D) atividades celulares que liberam DNA na circulação intencionalmente ou devido ao estresse, degradação e adaptação genética; (E) fragmentos de DNA fetal são liberados na circulação materna durante a gravidez; (F) efeitos sistêmicos da atividade fisiológica (por exemplo, exercício, obesidade ou envelhecimento). Essas fontes ou causas de liberação de DNA também podem interagir ou afetar uma à outra, contribuindo ainda mais para o pool de cfDNA. NET, armadilha extracelular de neutrófilos. Adaptado de Janine et al, 2018.

#### 1.4.1.2 Cell free DNA (cfDNA) e sepse

Nos últimos anos, cresceu, de forma significativa, o número de pesquisas que investigam cfDNA como biomarcador em doentes críticos, incluindo pacientes com sepse (Rodrigues et al, 2014). Os principais objetivos destes estudos do cfDNA como novo biomarcador foram o de avaliar o cfDNA como marcador de prognóstico de gravidade e mortalidade nos pacientes

sépticos internados em UTI e comparar seus níveis em pacientes críticos com ou sem sepse.

Um dos primeiros estudos a avaliarem cfDNA como biomarcador em pacientes internados em UTI foi realizado por Rhodes et al, 2006. Foram avaliados 52 pacientes, 19 com diagnóstico de sepse e 33 com patologia não infecciosa. As mensurações de cfDNA mostraram níveis mais elevados em pacientes com sepse e em pacientes que morreram na UTI ou no hospital (independente da patologia). Nos pacientes com sepse, os níveis de cfDNA eram mais elevados mesmo nos sobreviventes. cfDNA foi um preditor independente de mortalidade em UTI quando em concentração superior a 127ng/ml, com sensibilidade e a especificidade de 92 e 80% respectivamente.

Saukkonen avaliou 228 pacientes internados em UTI cirúrgica e não cirúrgicas, correlacionando maiores valores de cfDNA com valores mais altos do escores SOFA e APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*). A concentração máxima de cfDNA medida durante as primeiras 96 horas de terapia intensiva foi associada ao grau de disfunção orgânica e gravidade da doença. Além disso, cfDNA foi um preditor independentemente de mortalidade em UTI (Saukkonen et al, 2007)

Kiichi et al, avaliaram 423 pacientes internados em UTI em dois grandes centros e correlacionaram os níveis plasmáticos de cfDNA com mortalidade, sepse e síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS). Além da sepse, as principais causas de internação foram doenças cardiovasculares, pós operatório e trauma. OcfDNA foi um preditor de mortalidade para todas as patologias, com maiores valores na sepse e ARDS (Kiiichi et al, 2013).

Um dos pioneiros a estudar cfDNA e mortalidade na sepse foi Saukkonen avaliando os níveis de cfDNA em 255 pacientes com sepse e choque séptico por ocasião da admissão na UTI e 72 horas após a admissão. Em ambos os momentos de avaliação, os níveis de cfDNA foram significativamente mais altos nos não sobreviventes do que nos sobreviventes. Notavelmente, os níveis de DNA nuclear circulante no primeiro dia na UTI, foram um preditor independente de mortalidade na UTI, mas não de

mortalidade hospitalar. Além disso, concentrações elevadas de cfDNA foram associadas a maiores valores de lactato e do escore SOFA (Saukkonen et al, 2008).

Dhruva e colaboradores evidenciaram que os níveis de cfDNA no plasma foram melhores preditores de mortalidade quando comparados ao escore MODS (*Multiple Organ Dysfunction*) e APACHE II. A análise na curva ROC para mortalidade foi de 0,97 para cfDNA e 0,84 para os escores clínicos, e ao associar cfDNA com um dos escores, houve maior acurácia como preditor de mortalidade, com a área sob a curva (AUC) de 0,91. Um dado importante deste estudo foi que níveis de cfDNA não apresentaram diferença quando colhidos no primeiro dia e dias subsequentes (dia 7, 14, 21 e 28) (Dhruva et al, 2012).

O cfDNA também foi avaliado em pacientes sépticos com diferentes patógenos. Níveis de cfDNA em 132 pacientes com bacteremia causada por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus β-hemolyticus* e *Escherichia coli*. Os valores máximos obtidos entre 1 e 4 dias após as primeiras hemoculturas positivas foram significativamente mais elevados nos não sobreviventes do que nos sobreviventes. Níveis elevados (>1,52 µg/mL) de cfDNA foram um fator independente de risco para óbito (Huttunen et al, 2011).

Outro estudo avaliando cfDNA e mortalidade foi realizado em pacientes sépticos de UTI, com associação a caspase-3 e SOFA. Níveis de cfDNA e caspase-3 foram maiores em pacientes que não sobreviveram, porém não encontraram associação entre cfDNA e SOFA escore (Clement et al, 2015).

Na sepse, estratificar os pacientes com maior risco de complicações e gravidade tem extrema importância, o que poderia possibilitar intervenções terapêuticas mais precoces com consequente melhora dos desfecho destes pacientes. Nesse sentido, estudos com cfDNA como biomarcador de gravidade, e sua associação com os atuais marcadores e escores clínicos, vem adquirindo relevância clínica.

O cfDNA foi avaliado em alguns estudos como preditor de gravidade, e nesse contexto, sua associação com os atuais marcadores e escores clínicos parece ser mais promissora. Moreira e colaboradores mediram os níveis de cfDNA, procalcitonina (PCT) e proteína C-reativa (PCR) em 110 pacientes com diagnóstico de febre de origem desconhecida, infecção localizada, sepse ou choque séptico. Os níveis de cfDNA se correlacionaram com a gravidade da infecção. Além disso, a eficiência diagnóstica dos níveis de cfDNA foi similar à eficiência dos níveis de procalcitonina e da proteína C-reativa. Os resultados indicaram que níveis normais de cfDNA podem excluir a presença de infecção em pacientes febris, enquanto concentrações elevadas indicam uma infecção grave e apresentam um elevado valor prognóstico para mortalidade, na ausência de outras causas que justifiquem os valores elevados (Moreira et al, 2010).

Resultados diferentes foram encontrados por Montero et al, que avaliaram o valor prognóstico e diagnóstico de cfDNA, procalcitonina, PCR e eosinopenia em pacientes críticos com suspeita de sepse. Foram avaliados 160 pacientes, não sendo encontrado relevância estatística para uso de cfDNA nestes pacientes, com melhores resultados para pró-calcitonina e escore APACHE II (Montero et al, 2014).

Apesar dos avanços nos estudos do cfDNA como um biomarcador; ainda existe dificuldades na padronização de sua extração, assim como alto custo para sua quantificação por técnicas como o PCR (Reação em Cadeia Polimerase) em tempo real, dificultando sua aplicabilidade clínica. Rigorosos experimentos têm identificado fatores que afetam a produção e estabilidade de cfDNA, assim como sua contaminação (ex. células maternas, ruptura de células sanguíneas), sendo necessário uma padronização (ainda não existente) na coleta, processamento e extração do DNA. Atualmente o processamento de cfDNA ocorre no plasma e não no sangue, já que o plasma, teoricamente, tem menor probabilidade de contaminação de células sanguíneas, sendo importante o tempo entre a coleta e a centrifugação da amostra (Messaoudi et al, 2013). Avital et al, utilizaram uma técnica de fluorescência direta para quantificação de cfDNA, método que não requer extração de DNA ou amplificação por PCR, sendo de baixo custo e fácil reprodutibilidade. Neste

estudo, níveis elevados de cfDNA na admissão associaram-se a maior taxa de mortalidade hospitalar, enquanto níveis de pro-calcitonina não mostraram diferença estatística entre os sobreviventes e não sobreviventes (Avital et al, 2014).

Uma importante característica do cfDNA é seu rápido turnover. Tsumita e Iwanaga (1963) injetaram cfDNA marcado em ratos e mostraram que 99% da radioatividade desaparecia da circulação em 30 minutos. Estudos posteriores demonstraram que pacientes com doença renal crônica não apresentaram maior concentração de cfDNA, indicando que o rim não teria tanta importância no seu clearance, provavelmente devido a carga negativa deste marcador (Korabecna et al, 2008). Entretanto, os efeitos da disfunção renal e hepática nos níveis de cfDNA necessitam de maiores estudos.

Optamos por estudar o cfDNA como marcador de gravidade em todas as classes de sepse, englobando os pacientes com infecção visto que não existem dados na literatura de cfDNA nestes pacientes, e além disso, a grande maioria dos estudos correlacionam cfDNA com mortalidade e não gravidade. Na avaliação de mortalidade, avaliamos mortalidade hospitalar geral e não somente pacientes internados em UTI, já que o nosso protocolo de sepse poderia ser acionado em qualquer setor do hospital. Escolhemos a mensuração de cfDNA por fluorescência direta por ser um método mais barato, de fácil reprodutibilidade e aparelhagem disponível na pós graduação.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVOS PRIMÁRIOS :**

I. Avaliar os níveis circulantes de cfDNA como biomarcador para determinar o padrão de gravidade em infecção, sepse e choque séptico.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS :**

- I. Quantificar a expressão de cfDNA em amostra de plasma de pacientes com infecção, sepse e choque séptico.
- II. Correlacionar os níveis de cfDNA com variáveis clínicas e com o escore de gravidade SOFA
- III. Comparar diferentes métodos de dosagem de cfDNA (fluorescência e PCR) no plasma de pacientes com infecção, sepse e choque séptico .

### 3. METODOLOGIA E DELINEAMENTO

#### 3.1 CASUÍSTICA

Trata-se de um estudo prospectivo observacional transversal realizado no Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM). Foram incluídos 124 pacientes entre março de 2017 e dezembro de 2018, em todos os setores do hospital onde foi aberto o protocolo de sepse. O protocolo de sepse segue os critérios de classificação do ILAS e Sepses 3.0. Resumidamente, em pacientes apresentando sinais de infecção (tais como febre, hipotermia, taquicardia, taquipnéia, bacteremia, alteração do nível de consciência ou hipotensão... ) detectados por qualquer membro da equipe assistencial, deveria ser aberto protocolo de sepse com acionamento de um médico que faria a confirmação diagnóstica e classificação do caso como: infecção, sepse ou choque séptico. Para serem classificados em infecção, o quadro mais brando da doença, os pacientes apresentam piora clínica associados ao quadro infeccioso, mas sem disfunção orgânica, diferente dos pacientes com sepse que apresentam disfunção orgânica (respiratória, hemodinâmica, plaquetária, hepática, neurológica ou renal), e pacientes com choque séptico, que necessitam de uso de vasopressor para manter a pressão arterial média  $\geq 65$  mmHg associado a lactato  $\geq 2$ mmol/L.

A conduta clínica seguia o protocolo institucional de sepse que estava de acordo com o último guideline para tratamento da sepse conforme o *Surviving Sepsis Campaign* de 2016 (Rhodes et al, 2017).

Conforme o protocolo, os materiais para exames seriam prontamente colhidos, a antibioticoterapia seria administrada conforme o foco de infecção

em até 1 hora da abertura do protocolo e a reavaliação do paciente e exames para definição de disfunção orgânica. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUCAM (Número de Parecer 2889-718) e o termo de consentimento informado foi assinado pelos pacientes incluídos no estudo.

### 3.1.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

Pacientes com idade  $\geq 18$  anos que apresentaram, em algum momento da internação hospitalar ou na admissão, quadro compatível com infecção, sepse ou choque séptico.

### 3.1.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

Foram excluídos do estudo:

- Pacientes com quadro clínico compatível com terminalidade e/ou em cuidados paliativos.
- Pacientes imunossuprimidos ( $<1000$  neutrófilos/ $\mu\text{L}$ ) no diagnóstico da internação.

## 3.2 COLETA E ANÁLISE DOS DADOS

### 3.2.1 DADOS CLÍNICOS:

Os dados foram coletados nos prontuários de todos os pacientes incluídos no protocolo, incluindo os dados demográficos e laboratoriais, diagnóstico da internação, co-morbidades, mortalidade intra-hospitalar e SOFA score.

**Tabela 1: Escore SOFA** (Sequential Organ Failure Assessment).

SOFA	1	2	3	4
PaO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub> (mmHg) ou	<400	<300	<220	<100
SaO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub>	221-301	142-220	67-141	<67
Plaquetas x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	<150	<100	<50	<20
Bilirrubina (micromol/L)	20-32	33-101	102-204	>204
Hipotensão	PAM <70*	dopamina ≤5 ou qualquer dobutamina†	dopamina >5 ou noradrenalina ≤0.1	dopamina >15 ou noradrenalina >0.1
Escala de coma de Glasgow	13-14	10-12	6-9	<6
Creatina (micromol/L) ou débito urinário (mL/dia)	110-170	171-299	300-440 <500	>440 <200

\*PAM=pressão arterial média (mmHg)

† Agentes vasoativos administrados por pelo menos 1 hora (doses são administradas em microgramas/kg/minuto)

### 3.2.2 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO:

Todas as amostras de sangue foram coletadas por venopunção periférica realizada por profissional técnico habilitado para este fim seguindo as normas da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica para procedimentos de coleta de sangue venoso. Vale ressaltar que o material foi colhido dentro da rotina de atendimento ao paciente séptico no hospital, independente deste projeto de pesquisa. Para o cfDNA foi utilizado o mesmo tubo onde foi coletado o hemograma, tubo de ETDA (ácido etilenodiamino tetra-acético).

### 3.2.3 DADOS LABORATORIAIS PADRÃO PRECONIZADOS PELO PROTOCOLO DE SEPSE:

Após suspeição diagnóstica de infecção, sepse e/ou choque séptico, era feita a abertura do protocolo de sepse e a amostra para a realização dos exames era coletada em até trinta minutos. Exames preconizados pelo protocolo de sepse: Hemograma, Lactato, Ureia, Creatinina, TAP (tempo de atividade da protrombina), PTTK (tempo de tromboplastina parcial ativado), INR (International Normalized Ratio), Sódio, Potássio, Bilirrubinas totais e frações, gasometria arterial e PCR.

### 3.2.4 QUANTIFICAÇÃO DE CELL FREE DNA:

Após realização do hemograma, o tudo de ETDA foi centrifugado a 10,000g por 20 minutos a 4°C, e após a separação do plasma, este foi retirado e estocado em 2 criotubos contendo aproximadamente 2 ml da amostra e armazenados em freezer a -80°C para análise subsequente. Após o descongelamento, as amostras foram homogeneizadas por cerca de 30 segundos utilizando o agitador vórtex. Uma curva padrão com sete concentrações foi gerada por diluição de DNA de esperma de salmão comercial (Sigma-Aldrich). A curva foi avaliada em triplicatas resultando em curvas padrão usadas para calcular as concentrações de DNA. As concentrações cfDNA foram analisadas com um corante nuclear fluorescente (SYBR Gold) nas amostras. Resumidamente, o SYBR Gold (diluição 1: 10.000 em PBS) foi adicionado ao plasma em 96 poços negros. A fluorescência foi registrada usando um fluorômetro Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, EUA) com um comprimento de onda de excitação de 485nm e emissão de 535nm (Goldshtein et al, 2009).

## 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como mediana e intervalo interquartil (IRQs, 25th to 75th percentiles), ou como valores absolutos e porcentagem. Comparamos as diferenças entre as variáveis contínuas com teste de Mann – Whitney e Teste-*t* Independente; Chi-quadrado de Pearson ou Exato de Fischer foram aplicados para comparar as variáveis categóricas.

Para determinar o quanto as variáveis independentes são capazes de prever a classificação de sepse foi realizada Regressão Logística Binária com base na análise univariada onde as variáveis que apresentaram  $p < 0,25$  foram consideradas para inclusão no modelo de Regressão Logística. No modelo de regressão logística, a variável dependente foi infecção ou sepse/choque séptico (0 infecção; 1 sepse/choque séptico) e as variáveis independentes foram os fatores sócio demográficos (idade), comorbidades (diabetes melitus, hipertensão arterial, hepatopatia e cardiopatia), foco infeccioso pulmonar,

escore SOFA e variáveis laboratoriais que não possuem correlação com o SOFA (leucócitos, lactato, INR, cfDNA).

Para determinar o poder discriminativo do cfDNA e SOFA para gravidade, construímos curvas ROC e calculamos as áreas sob a curva (AUCs) com ICs de 95%. O melhor cut off maximizando a soma de sensibilidade e especificidade foi definido, e calculamos as razões de sensibilidade, especificidade e verossimilhança positiva com ICs de 95% usando o MedCalc software 12,7 trial version.

A análise inferencial foi conduzida utilizando o software SPSS (IBM 19). Adotou-se nível de significância de  $p < 0,05$  para todas as análises.

## 5 RESULTADOS

Um total de 124 pacientes foram incluídos no estudo, 37 classificados como infecção e 87 como sepse/choque séptico. A média de idade foi de 61 anos, com 51,6% do sexo masculino, sendo que o grupo sepse/choque séptico apresentou média de idade de 65 anos e no grupo infecção 52 anos. As principais co-morbidades foram hipertensão arterial sistêmica (41,8%) e diabetes mellitus (31,3%). Os focos pulmonar (27,9%) e abdominal (19,7%) foram os mais prevalentes. A maioria das infecções foram de origem hospitalar (57,4%), não havendo diferença entre infecções comunitárias e hospitalares entre as classificações de sepse. O Hospital Universitário, por ser um hospital de alta complexidade, a grande maioria das internações são referenciadas de outros serviços, por isso o número reduzido de infecções comunitárias e por ser referência em cirurgia do aparelho digestivo foi observado um número elevado de pacientes com infecção por foco abdominal. A letalidade geral foi de 28,7% ( $n=35$ ) e nos pacientes com sepse/choque séptico de 37,3% ( $n=31$ ,  $p<0,01$ ). Os pacientes com sepse/choque séptico também apresentaram maior número de qSOFA positivos ( $p<0,01$ ), e maior escore SOFA, com mediana de

6,0, quando comparados com pacientes com infecção cuja a mediana foi 1,0 ( $p<0,01$ ) (tabela 2). Internação em UTI foi associada a pior gravidade ( $p<0,01$ ).

Dentre as seis disfunções de órgãos presentes na classificação do SOFA (disfunção hemodinâmica, respiratória, renal, neurológica, plaquetária e hepática), a disfunção respiratória e hemodinâmica foram as mais prevalentes (37,7% e 36,9% respectivamente), e somente a disfunção plaquetária e hepática não apresentaram correlação com gravidade ( $p<0,05$ ).

A análise laboratorial com quantificação de leucócitos, creatinina, lactato, INR, bilirrubinas totais e cfDNA apresentaram níveis mais elevados no grupo com sepse e choque séptico ( $P<0,05$ ), exceto para PCR ( $p=0,79$ ), contagem de leucócitos ( $p=0,17$ ) e plaquetas ( $p=0,79$ ) (tabela 3).

**Tabela 2. Perfil demográfico e clínico dos pacientes.**

	<b>Todos</b>	<b>Infecção</b>	<b>Sepse/Choque</b>	<b>P valor</b>
<b>N</b>	124	37	87	
<b>Sexo masculino, n (%)</b>	63 (51,6)	16 (41)	47 (56,6)	0,1
<b>Idade, mediana (IQR)</b>	61 (45-73,2)	52 (33-66)	65 (52-76)	<b>&lt;0,01</b>
<b>Internação UTI, n (%)</b>	49 (40,2)	8 (20,5)	41 (49,4)	<b>&lt;0,01</b>
<b>SOFA, mediana (IQR)</b>	4 (2-7,2)	1 (0-2)	6 (3-10)	<b>&lt;0,01</b>
<b>QSOFA positivo, n (%)</b>	68 (55,7)	8 (20,5)	60 (72,3)	<b>&lt;0,01</b>
<b>Letalidade, n (%)</b>	35 (28,7)	4 (10,3)	31 (37,3)	<b>&lt;0,01</b>
<b>Comorbidades</b>				
Nunhuma, n (%)	20 (16,4)	9 (23,1)	11 (13,3)	0,27
HAS, n (%)	51 (41,8)	12 (30,8)	39 (47)	0,09
DM, n (%)	32 (31,3)	6 (15,4)	26 (31,3)	0,06
Cardiopata, n (%)	24 (19,7)	5 (12,8)	19 (22,9)	0,19
Doença renal, n (%)	10 (8,2)	5 (6)	5 (12,8)	0,28 *
Neoplasia, n (%)	19 (15,6)	5 (12,8)	14 (16,9)	0,56

Doença Hepática, n (%)	5 (4,1)	0	5 (6)	0,17*
<b>Foco Infeccioso</b>				
Respiratório, n (%)	34 (27,9)	7 (17,9)	27 (32,5)	0,09
Abdominal, n (%)	24 (19,7)	8 (20,5)	16 (19,3)	0,87
Urinário, n (%)	21 (17,2)	9 (23,1)	12 (14,5)	0,26
Cutâneo, n (%)	10 (8,2)	5 (12,8)	5 (6)	0,28*
Cateter, n (%)	4 (3,3)	1 (2,6)	3 (3,6)	1,0*
Ginecológico, n (%)	27 (22,1)	7 (17,9)	20 (24,1)	0,44
Sem foco definido, n (%)	3 (2,5)	2 (5,1)	1 (1,2)	0,27*
<b>Infecção hospitalar, n (%)</b>	<b>70 (57,4)</b>	<b>22 (56,4)</b>	<b>48 (57,8)</b>	<b>0,88</b>

Dados expressos em número e percentagem, exceto para a idade e SOFA, expressos em mediana e intervalo interquartil (IQR) desvio padrão. HAS, Hipertensão arterial sistêmica; DM, Diabetes mellitus, SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; QSOFA, quickSOFA . Diferença de proporção ( $P < 0,05$ ); Para comparação, foi utilizado teste T, Mann-Whitney e qui-quadrado.\* Teste exato de Fisher.

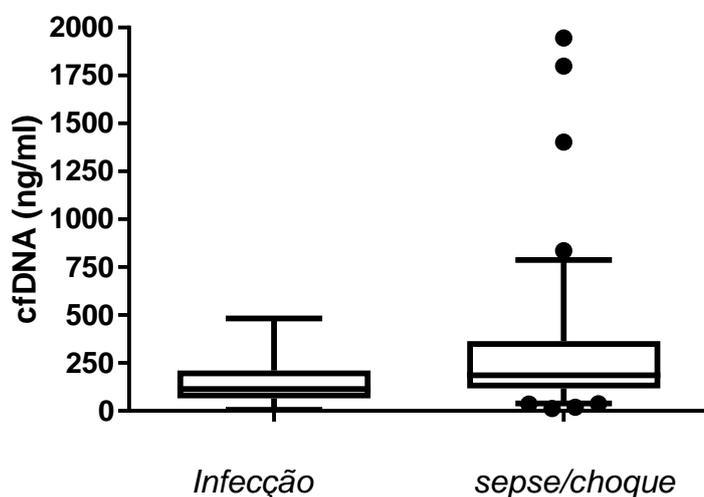
**Tabela 3. Características bioquímicas de acordo com a gravidade de infecção.**

	<b>Todos</b>	<b>Infecção</b>	<b>Sepse/Choque</b>	<b>P valor</b>
<b>cfDNA (ng/mL)</b>	170 (97-318)	113,5 (66,1-210,3)	186,2 (117,1-363,5)	<b>&lt;0,01</b>
<b>Leu (mil/mm<sup>3</sup>)</b>	12,4 (8,6 -17,3)	10,9 (8,5-15,8)	13,2 (8,6 -20,5)	0,17
<b>Bil Total (mg/dL)</b>	1,0 (0,58-1,51)	0,7 (0,43-1,25)	1,08 (0,69-1,94)	<b>0,01</b>
<b>Plaq (mil/mm<sup>3</sup>)</b>	240 (136 -326)	262 (136-314)	237 (135-328)	0,79
<b>RNI</b>	1,19 (1,03-1,34)	1,12 (1,0-1,22)	1,2 (1,0-1,44)	<b>0,02</b>
<b>PCR (mg/dL)</b>	106 (50-126)	94,8 (43,9-124)	108 (57-126)	0,79
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	1,22 (0,71-2,5)	0,74 (0,58-1,03)	1,74 (0,9-3,0)	<b>&lt;0,01</b>
<b>Lactato (mmol/L)</b>	1,9 (1,3-3,3)	1,4 (1,0-2,3)	2,1 (1,4-3,6)	<b>&lt;0,01</b>

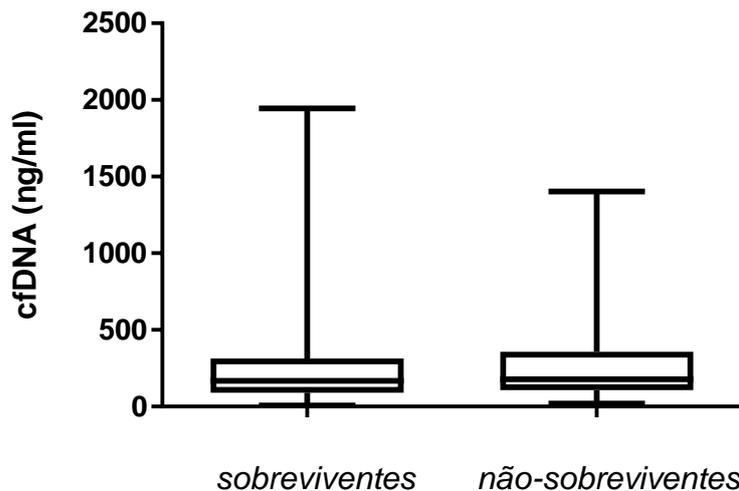
Dados expressos em mediana e intervalo interquartil (IQR) 1-3 (25-75%). PCR, proteína C reativa; INR, International Normalized Ratio; cfDNA, cell free DNA. Para comparação foi utilizado teste de Mann-Whitney

### 5.1 VALOR PROGNÓSTICO DE cf-DNA PARA PACIENTES SÉPTICOS

Conforme mostrado na Figura 4, a concentração de cfDNA foi maior nos pacientes mais graves, isto é, portadores de sepse ou sepse/choque. Diferenças estatísticas significantes foram observadas entre os valores de cfDNA nos pacientes com sepse e choque séptico comparados a pacientes com infecção (186,2 ng/mL (IQR 117,1-365,5) vs. 113,5ng/mL (IQR 66,1-210,3),  $p < 0,01$ ). Entretanto, ao analisarmos o desfecho letalidade, não houve diferença estatística entre os grupos (teste de Mann-Whiney , $p = 0,37$ ), Figura 5.

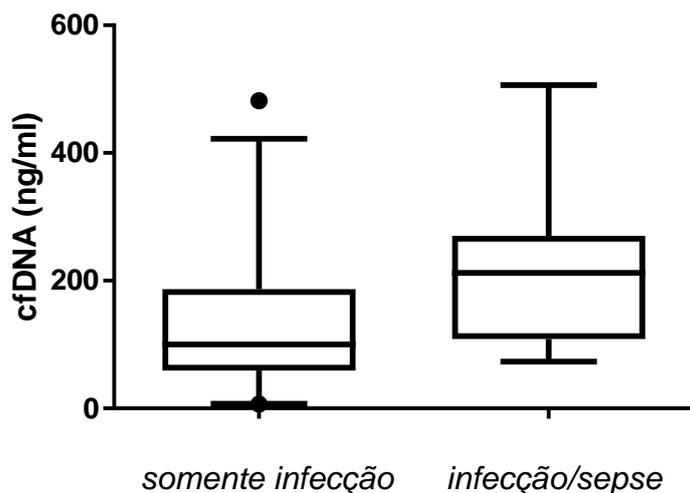


**Figura 4. Concentrações de cfDNA (ng/ml) e gravidade.** Boxplots comparando medidas do nível de cfDNA expressas em ng/ml no plasma de pacientes com infecção (mediana 113,5 ng/mL; IQR 117.1-36.5.5) e sepse/choque séptico (186,2 ng/mL; IQR 66.1-210.3). Os níveis de cfDNA no plasma são apresentados como mediana (linha preta), intervalo interquartil (box) e percentis 5 e 95 (whiskers). cfDNA, cell free DNA; IQR, Intervalo interquartil. Teste de Man Whitney, \* $p < 0,01$ .



**Figura 5. Concentrações de CF-DNA (ng/ml) em pacientes sobreviventes e não sobreviventes.** Boxplots comparando medidas do nível de cfDNA expresso em ng/mL no plasma de pacientes sobreviventes (mediana 117,9 ng/mL; IQR 106,4-357,6) e pacientes não sobreviventes (mediana 167,2 ng/mL; IQR 90,3-314,5). Os níveis de cfDNA no plasma são apresentados como mediana (linha preta), intervalo interquartil (box) e percentis 5 e 95 (whiskers). cfDNA, cell free DNA; IQR, Intervalo interquartil. Teste de Man Whitney, \* $p=0,37$ .

Os resultados evidenciaram que o cfDNA se apresentou como um marcador para gravidade para pacientes sépticos/choque séptico; desta forma, fizemos uma análise no subgrupo infecção para avaliar se existia diferenças na concentração de cfDNA nos pacientes que evoluíram com pior desfecho para gravidade. Durante a análise do subgrupo infecção, fizemos uma análise retrospectiva dos pacientes com infecção ( $n=37$ ) que evoluíram para sepse/choque séptico ( $n=13$ ), e notamos que pacientes com pior evolução apresentaram concentrações mais elevadas de cfDNA comparados com pacientes que não apresentaram disfunção de órgão, mediana de 212,2 ng/mL (IQR 73,18-270,3) vs. 100,3 ng/mL (IQR 59,35-186) (teste de Mann-Whiney , $p=0,012$ ). (Figura 6).



**Figura 6. Concentrações de cfDNA (ng/ml) em pacientes com infecção e desfecho.** Boxplots comparando medidas do nível de cfDNA expressas em ng/ml no plasma de pacientes com infecção que evoluíram para sepse/choque (mediana 212,3; IQR 73,18-270,3) e pacientes que não evoluíram para disfunção orgânica (mediana 100,25; IQR 59,35-186 ). Os níveis de cfDNA no plasma são apresentados como mediana (linha preta), intervalo interquartil (box) e percentis 5 e 95 (whiskers). cfDNA, cell free DNA; IQR, Intervalo interquartil. Teste de Man Whitney, \* $p=0,012$ .

A partir dos resultados obtidos da análise univariada demonstrados nas Tabela 2 e 3, foi realizada a análise de regressão logística binária para avaliar se o cfDNA e outras variáveis disponíveis eram preditoras independentes para o prognóstico da doença.

Regressão logística binária, foi realizada em todas as variáveis da análise univariada (tabela 2, tabela 3) que apresentaram  $P \leq 0,25$ , exceto as que derivam de colinearidade com o SOFA.

Para variável dependente infecção e sepse/choque séptico, dos 13 modelos de Regressão Logística analisados, o que apresentou o melhor desempenho foi o 1º (Omnibus teste:  $\chi^2 = 89,66$   $p = 0,00$ ; Hosmer e Lemeshow:  $\chi^2 = 8,78$ ,  $p = 0,36$ ), descrito na tabela 4.

Esse modelo explicou 72% da variância, e das 14 variáveis adicionadas na equação, as variáveis cfDNA (95% IC 1,002-1,012,  $p=0,005$ ) e escore de SOFA (95% IC 1,579-3,730,  $p=0,000$ ) foram significantes preditores de gravidade. Não houve significância estatística para nenhuma das outras 12 variáveis. Após a regressão logística das 14 variáveis em conjunto, fomos eliminando algumas variáveis, e a melhor acurácia do cfDNA em prever gravidade foi quando associamos somente SOFA e internação na UTI (tabela 5), sendo que a internação em UTI apresentou um  $p$  limítrofe ( $P=0,066$ ) como preditor de gravidade neste modelo.

**Tabela 4. Regressão Logística Binária entre as variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais e gravidade.**

Variáveis Independentes	OR	IC95%	<i>p</i>
Idade	0,995	0,952-1,039	0,804
Sexo	0,405	0,076-2,0469	0,291
HAS	0,410	0,66-2,547	0,339
DM	2,589	0,923-11,948	0,189
Cardiopatia	1,548	0,266-8,991	0,626
Hepatopatia	488899454,724	0,000-	0,999
Foco Pulmonar	4,445	0,960-20,583	0,056
Internação em UTI	2,133	0,474-9,602	0,324
Letalidade	0,522	0,75-3,625	0,511
SOFA	<b>2,42</b>	<b>1,579-3,730</b>	<b>&lt;0,01</b>
CfDNA	<b>1,007</b>	<b>1,002-1,012</b>	<b>&lt;0,01</b>
Lactato	1,066	0,779	1,460
INR	1,4	0,15-12,84	0,75

<b>Creatinina</b>	1,23	0,77-1,97	0,36
-------------------	------	-----------	------

OR – Odds Ratio; IC – Intervalo de Confiança \*  $p < 0,05$ . DM, Diabetes mellitus; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment, CfDNA, cell free DNA , UTI, Unidade de Terapia Intensiva, INR, International Normalized Ratio;

**Tabela 5. Regressão Logística Binária entre cfDNA, SOFA e internação em UTI para gravidade.**

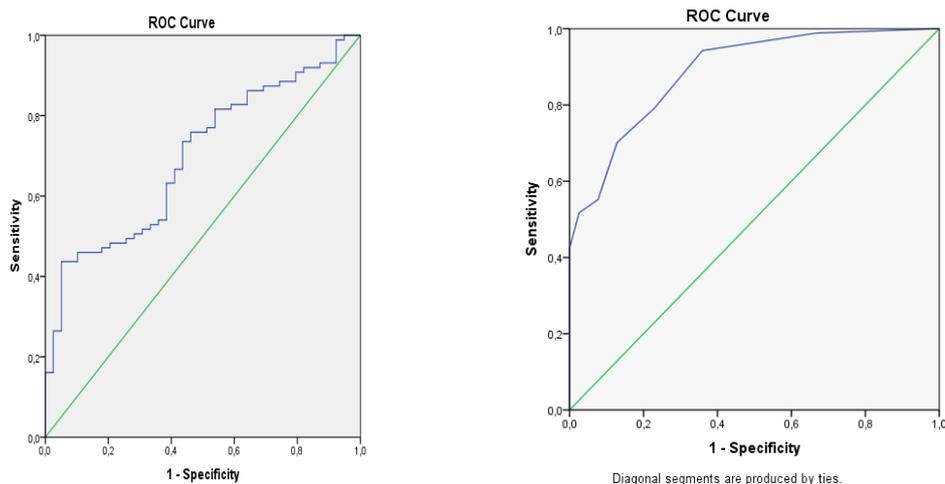
<b>Variáveis Independentes</b>	<b>OR</b>	<b>IC95%</b>	<b><i>p</i></b>
<b>CfDNA</b>	1,006	1,002-1,101	0,804
<b>SOFA</b>	2,107	1,485-2,988	0,291
<b>Internação em UTI</b>	3,320	0,923-11,948	0,066

Para determinar o poder discriminativo do cfDNA e SOFA para gravidade, construímos curvas ROC e calculamos as áreas sob a curva (AUCs) com ICs de 95% (Intervalo de confiança de 95%).

A análise da curva ROC para gravidade obteve melhores resultados com o SOFA (AUC 0,88, IC95% 0,82-0,94) comparando com cfDNA (AUC 0,69, IC95% 0,63-0,79). Figura 7A. Figura 7B.

Figura 7A

Figura 7B



	AUC	IC 95%	Sensibilidade(%)	Especificidade(%)	VVP(%)	VPN(%)	LR+	LR-
SOFA	0,88	0,82-0,4	94,2	64	85	83,3	2,6	0,09
CFDNA	0,69	0,60-0,79	43,6	92,3	92,7	42,3	5,97	0,61

**Figura 7: Curva ROC (Receiver-operating characteristic curves) para gravidade.** (A) Curva ROC cfDNA e gravidade, (B) curva ROC SOFA e gravidade. SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; CFDNA, cell free DNA; AUC, área sob a curva; IC 95% ,Intervalo de confiança de 95%; VPP, valor preditivo positivo; VPN, valor preditivo negativo, LR +, likelihood ratio positivo; LR-, likelihood ratio negativo.

## 6 DISCUSSÃO

O nosso estudo foi desenvolvido para avaliar o valor prognóstico do cfDNA em pacientes com diferentes classificações de sepse e compará-lo com os marcadores já existentes e escores utilizados na prática clínica. Os nossos resultados evidenciaram maiores concentrações de cfDNA conforme a gravidade da doença. Valores mais elevados de cfDNA plasmático foram observados nos pacientes com sepse e choque séptico comparados a pacientes com infecção. Além disso, em uma análise de subgrupo, pacientes com infecção que evoluíram para sepse/choque séptico apresentaram concentrações mais elevadas de cfDNA, comparados com pacientes com infecção que não apresentaram disfunção de órgão. Analisando preditores de gravidade, ao comparar cfDNA com os atuais marcadores utilizados na prática

clínica como o lactato e escore de SOFA, cfDNA e o SOFA foram os únicos que apresentaram significância estatística na análise multivariada. Contudo, análise da curva ROC para gravidade obteve melhores resultados para o SOFA (AUC 0,88, IC95% 0,82-0,94) comparado com cfDNA (AUC 0,69, IC95% 0,63-0,79).

Avaliamos 124 pacientes que abriram o protocolo de sepse em diferentes setores do hospital, com a maioria dos protocolos abertos fora de ambiente de UTI (59,8%). A maioria dos pacientes foram classificados como sepse/choque séptico (67,7%), os quais apresentavam maiores valores de SOFA (mediana 6,0), maior número de qSOFA positivos, mais internações em UTI, e maior letalidade (37,3%) quando comparados com o grupo infecção. Estes dados correlacionam-se com os do último relatório anual do ILAS (2018) de hospitais públicos e privados do Brasil, com inclusão de 12504 pacientes com sepse e choque séptico, e 76 centros participantes no Brasil. Neste último relatório do ILAS realizado em hospitais públicos brasileiros, foi evidenciado que 52,5% dos pacientes foram tratados em ambiente fora da UTI, com média de idade de 60 anos, sendo os focos mais prevalentes o pulmonar (51,3%), trato urinário (13,9%) e abdominal (10,7%). A média de SOFA foi de 5,5 e a taxa de letalidade de 47,8%. Diante o exposto, os nossos resultados assemelham-se ao do ILAS, exceto pela maior prevalência de foco abdominal em relação ao trato urinário, visto que o nosso hospital é referência para cirurgias do aparelho digestivo. Dados mundiais conforme o último “Open Forum Infectious Diseases” (Jean-Louis et al, 2018), realizado somente em ambiente de UTI, envolvendo auditoria de sepse e choque séptico em diferentes continentes, incluindo Europa, Ásia, América e outros continentes, revelaram uma média de idade de 61 anos, com os focos respiratórios (74,7%), urinário (17,4%) e abdominal (16,8%) os mais prevalentes. A média de SOFA foi de 8, a taxa de letalidade de 33,8%, o que realmente diferencia-se dos dados brasileiros, principalmente em hospitais públicos onde a letalidade é ainda mais elevada. Entretanto, a grande maioria das auditorias realizadas em sepse, não fornecem dados sobre pacientes com infecção, somente disponibilizam dados sobre pacientes mais graves, ou seja, com sepse e choque séptico. Em nosso trabalho foi possível avaliar os pacientes com

infecção com as mesmas informações obtidas para o grupo sepse/choque séptico.

Apesar dos crescentes avanços na terapia para tratamento da sepse e choque séptico ainda se observam altas taxas de mortalidade (Jean-Louis et al, 2018; Suzana et al, 2019), principalmente em países subdesenvolvidos onde existe baixa sensibilidade para o diagnóstico desta grave doença (Flávia et al, 2017; Suzana et al, 2019). Atualmente, o combate à síndrome, baseia-se no diagnóstico precoce e início precoce da terapêutica para evitar a evolução da disfunção de órgãos (Kim et al, 2019; Francisco et al, 2018; Jihane et al, 2018). Mais importante ainda, a sepse é uma doença heterogênea, sem um padrão ouro confiável para diagnóstico. Devido à baixa sensibilidade de hemoculturas positivas, média mundial 19,5%, sendo a média do nosso estudo de 12%, muitos casos são diagnosticados com base no ambiente clínico com grande variabilidade entre os diagnósticos (Marco et al, 2012; Salomão, 2019)

Por anos, a pluralidade de definições para caracterizar o paciente com sepse constituiu importante limitação para o seu melhor diagnóstico ou reconhecimento. Desde de 1992, a Society of Critical Care Medicine (SCCM), o American College of Chest Physicians (ACCP) e European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), reúnem-se para padronizar as definições sepse. Em 2016, foram publicadas novas definições baseadas em uma análise bastante robusta de grandes bancos de dados, basicamente americanos, na qual houve uma mudança conceitual e no diagnóstico de sepse, com o objetivo de melhorar a especificidade do diagnóstico em países desenvolvidos (Singer et al, 2016). Entretanto, para fins práticos, o entendimento do ILAS, assim como o Surviving Sepsis Campaign, é de que os novos conceitos podem prejudicar a triagem para suspeição precoce de infecção, ou seja, para países subdesenvolvidos, onde a sensibilidade no diagnóstico ainda é baixa, a nova definição é bastante questionada, pois este novo conceito prioriza especificidade e não sensibilidade. Diante disso, facilitar o diagnóstico, possibilitando intervenções terapêuticas precoces, tem sido o objetivo de vários estudos em pacientes com sepse. Desta forma como nosso trabalho foi desenvolvido no Brasil, optamos por manter a classificação de acordo com as

orientações do ILAS e adequar a nova nomenclatura. Apesar de não utilizarmos o delta SOFA para o diagnóstico foi possível calcular o SOFA de todos os pacientes e eles apresentaram uma mediana de 6 para sepse/choque séptico, o que demonstra que nossos pacientes tinham um SOFA de 2 ou maior que 2. Vale ressaltar que nosso estudo tem o diferencial de incluir pacientes do hospital como um todo, não somente de UTI, portanto o cálculo do delta SOFA fora do UTI é de difícil execução. Alguns estudos realizados em países de baixa renda comparando qSOFA e SOFA, quando aplicados a pacientes com sepse e choque séptico no cenário de pronto-socorro, demonstraram eficácia do qSOFA na previsão da letalidade hospitalar (Baig et al, 2018); já no nosso estudo, o qSOFA foi uma ferramenta ineficaz em prever letalidade, uma vez que incluímos diversos setores do hospital, não somente pronto socorro, assim como todas as classificações de sepse.

Dentro deste contexto, o estudo de biomarcadores na sepse vem crescendo nos últimos anos. Em 2010 Pierrakos e Vincent estimaram que ao menos 178 biomarcadores de sepse foram relatados na literatura (Pierrakos et al, 2010 ). A detecção desses biomarcadores é uma alternativa minimamente invasiva para o diagnóstico e o prognóstico da sepse (Hector et al, 2014 ). Dentre eles, incluímos proteínas de fase aguda como PCR, pró-calcitonina, citocinas pro e anti inflamatórias; proteínas de superfície celular (moléculas de adesão); marcadores de coagulação e apoptose (Dupuy et al , 2013 ).

Entre os biomarcadores já utilizados na prática clínica, nossos resultados, na análise univariada, demonstraram uma correlação do lactato, conforme a gravidade da sepse. Pacientes com infecção apresentavam menores valores de lactato (mediana 1,4) comparado aos com sepse/choque séptico (mediana 2,1),  $p < 0,01$ . Contudo, ao compararmos PCR entre os grupos, não houve diferença, com mediana de 94,8 na infecção e 108 na sepse/choque séptico,  $p = 0,79$ . Resultados na literatura correlacionam-se aos nossos resultados em relação ao lactato (Ha Eun et al, 2016; John et al, 2017; Taniguchi et al, 2017). Entretanto estudos com a utilização de PCR como

preditor de gravidade são conflitantes, com a grande maioria evidenciando superioridade do lactato e pró-calcitonina à PCR (Luzzani et al, 2003; Waheeda, 2014; Chinelo et al, 2017; Seung et al, 2019). Infelizmente a pró-calcitonina não está disponível na grande maioria dos hospitais públicos brasileiros e não foi possível avaliar as citocinas.

A identificação de biomarcadores relevantes e úteis na sepse apresenta muitos desafios. Nos últimos anos, pesquisas que investigam cfDNA como biomarcador na sepse tem adquirindo relevância, sendo principalmente estudado como preditor de gravidade e mortalidade em UTI.

Nossos resultados mostram que há um aumento das concentrações de cfDNA, proporcional a gravidade da infecção, em plasma de pacientes coletado dentro de 30 minutos da abertura do protocolo de sepse. Entretanto, no nosso estudo, maiores valores de cfDNA não foram associados a mortalidade hospitalar. Vale ressaltar, que um grande percentual de pacientes incluídos no nosso estudo (59,8%) estavam internados fora do ambiente de terapia intensiva. Diferentes estudos avaliando cfDNA em pacientes sépticos demonstraram o aumento deste biomarcador como preditor de mortalidade em UTI, mas com menor acurácia em prever mortalidade hospitalar. Saukkonen et al, descreveram que níveis de cfDNA, no primeiro dia na UTI, foram um preditor independente de mortalidade na UTI, mas não de mortalidade hospitalar (Saukkonen et al, 2008). Já Avital e colaboradores, associaram níveis elevados a maior taxa de mortalidade hospitalar (avaliada dentro de 28 dias após o diagnóstico de sepse) (Avital et al, 2014), assim como Rhodes, que demonstrou níveis mais elevados de cfDNA em pacientes com sepse que morreram na UTI ou no hospital. cfDNA foi um preditor independente de mortalidade em UTI, quando se utilizaram concentrações superiores a 127ng/ml, com sensibilidade e a especificidade de 92 e 80% respectivamente (Rhodes et al, 2006). Embora a maioria dos estudos tenham associação positiva entre cfDNA e mortalidade, Garnacho e colaboradores, compararam este novo biomarcador com procalcitonina, eosinopenia e PCR, e tanto cfDNA, como PCR e eosinopenia não se apresentaram como preditores de mortalidade (Garnacho et al, 2014). Apesar do cfDNA ter ser mostrado como um bom

preditor de mortalidade os dados ainda são controversos e são necessários mais estudos para entender melhor o cfDNA como um biomarcador na sepse.

Nossos dados demonstraram que cfDNA nesta população estudada, comparado com os atuais marcadores utilizados na clínica, como lactato, leucócitos, bilirrubinas totais, INR e PCR, foi superior como preditor de gravidade em pacientes sépticos. O uso do cfDNA como preditor de gravidade na sepse vem sendo estudado, mas ainda existem poucos trabalhos e com número limitado de pacientes. Associações entre cfDNA, pró-calcitonina, PCR, caspase, interleucinas e lactato, já foram alvo de alguns estudos em pacientes sépticos para avaliar desfecho, demonstrando a superioridade deste novo biomarcador aos marcadores já conhecidos (Anna et al, 2015). Anna e colaboradores avaliaram 27 pacientes com sepse e choque séptico internados em UTI e compararam níveis de cfDNA com caspase-3, IL-6, IL-8 e lactato. Neste estudo, cfDNA foi considerado um bom marcador de prognóstico, assim como caspase-3, interleucinas e lactato, com níveis mais elevados associados a insuficiência renal aguda (IRA) com necessidade de terapia renal substitutiva, na ocasião diálise contínua, assim como maiores valores associados a tempo de ventilação mecânica (Anna et al, 2015). Assim como no referido estudo, cfDNA na nossa casuística, mostrou-se promissor como marcador de gravidade, contudo os principais marcadores disponíveis na prática clínica como PCR e lactato, não foram significantes em estabelecer prognóstico. Na análise univariada, lactato, creatinina, INR, bilirrubinas totais e cfDNA foram estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) para classificação de sepse, contudo, na análise multivariada, somente o cfDNA e escore SOFA foram considerados preditores de gravidade ( $p < 0,01$ ).

Nas últimas três décadas, foram utilizados diversos escores prognósticos para prever gravidade em pacientes sépticos. Os principais escores na prática clínica são: Acute physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE), Simplified Acute Physiology Change (SAPS) e SOFA desenvolvidos para ambiente de Terapia Intensiva. As variáveis preditivas comumente utilizadas nesses escores são idade, presença de co-morbidades e alterações fisiológicas. Nosso estudo avaliou o score de SOFA dos pacientes sépticos,

pois ele foi indicado para diagnóstico da sepse. De todas as variáveis utilizadas na regressão logística (cfDNA, idade, sexo, HAS, DM, cardiopatia, hepatopatia, foco pulmonar, internação em UTI, SOFA, lactato, INR, creatinina), somente cfDNA (95% IC 1,002-1,012,  $p=0,005$ ) e escore de SOFA (95% IC 1,579-3,730,  $p=0,000$ ) foram fortes e significantes preditores de gravidade. Não houve significância estatística para nenhuma das outras variáveis.

Um dos primeiros estudos a avaliar o prognóstico de cfDNA em 255 pacientes com sepse e choque séptico foi realizado por Saukkonen, onde concentrações plasmáticas de cfDNA foi comparada com escores utilizados na prática clínica, dentre eles SOFA, APACHE II e SAPS II. CF- DNA, SOFA, SAPS II e maiores concentrações de cfDNA foram preditores independentes para prognóstico em UTI e não hospitalar, com análise posterior de curva ROC evidenciando superioridade dos escores em relação ao cfDNA (Saukkonen et al, 2008). Os estudos mais relevantes correlacionam cfDNA e mortalidade de UTI. A associação entre cfDNA, marcadores já utilizados e escores clínicos, tendo como desfecho gravidade, ainda é pequena e pouco estudada.

Nossos resultados, somente SOFA e cfDNA mostraram-se como preditores independentes na classificação de sepse, sendo o poder discriminatório do SOFA como preditor de gravidade superior ao do cfDNA (AUC 0,88, IC95% 0,82-0,94 vs AUC 0,69, IC95% 0,63-0,79 respectivamente). Os nossos dados corroboram com os principais estudos onde os escores clínicos como SOFA, APACHE e SAPS II são superiores a qualquer biomarcador (Saukkonen et al, 2008; Montero et al, 2017), ainda que a combinação de ambos aumente o valor preditivo para estratificação de risco na sepse (Dhruva et al, 2012). Portanto, até o momento, cfDNA apresenta-se como um preditor independente de mortalidade na sepse, com poucos trabalhos avaliando gravidade, contudo, este novo biomarcador, ainda não superou os escores clínicos como SOFA, APACHE II e SAPS II.

A partir dos achados de que cfDNA plasmático se mostrou como um preditor de gravidade entre os grupo infecção e sepse/choque séptico, optamos por avaliar dentro do grupo infecção se aqueles pacientes que evoluíram para um pior desfecho, teriam cfDNA mais alto. Foi observado um

dados bastante interessante, porém de amostra reduzida. Níveis de cfDNA plasmático, de amostra única colhida logo após abertura do protocolo de sepse, estavam mais elevados em pacientes classificados como infecção que evoluíram para sepse ou choque séptico. Notamos que pacientes com pior evolução apresentaram concentrações mais elevadas de cfDNA comparados com pacientes que não apresentaram disfunção de órgão após a abertura do protocolo de sepse. Não existem dados na literatura sobre cfDNA em pacientes classificados como infecção e desfecho destes pacientes isoladamente, e conforme os dados apresentados, mesmo que em uma amostra pequena, pesquisas futuras neste contexto são necessárias.

Nosso estudo realizou a coleta de amostra sanguínea somente em um momento, ou seja dentro de 30 minutos após a abertura do protocolo de sepse. A coleta do cfDNA, juntamente com outros exames bioquímicos, era realizada ao se identificar o paciente com sepse, e na grande maioria das vezes, fora de ambiente de UTI. Pesquisas anteriores demonstrando diferentes tempos de coleta de cfDNA, não somente na admissão de UTI, mas diariamente na primeira semana, ou 48 horas e 72 horas da admissão, obtiveram melhores resultados em prever mortalidade, com cfDNA colhido na admissão da UTI (Dhruva et al, 2012; Saukkonen et al, 2008, Ganacho et al, 2014). Excetuando-se esses três estudos, os demais não fizeram curva temporal de cfDNA, nos baseamos nos resultados supracitados que o cfDNA colhido na admissão na UTI é o mais fidedigno, e optamos por colher este biomarcador somente na abertura do protocolo de sepse.

Ainda existem muitos pontos que necessitam de padronização para melhor reprodução dos dados de cfDNA na literatura. Apesar dos avanços nos estudos do cfDNA como um biomarcador, dificuldade na padronização de sua extração, assim como alto custo na realização do método mais utilizado para quantificação, o PCR (Reação em Cadeia Polimerase) em tempo real, dificultam a sua aplicabilidade clínica (Dwiedl et al, 2012; Peter et al, 2018). Objetivando otimizar custo, utilizamos a técnica de fluorescência direta para quantificação de cfDNA, método que não requer extração de DNA ou amplificação por PCR, sendo de baixo custo e fácil reprodutibilidade, e que já

fora aplicada na quantificação de cfDNA em pacientes sépticos, principalmente como preditor de mortalidade (Avital et al, 2014).

O nosso estudo difere-se dos anteriores por ter sido realizado em qualquer ambiente hospitalar (enfermaria, terapia intensiva e pronto socorro) e abranger todas as classificações de sepse: infecção, sepse e choque séptico. Além disso, ao analisar desfecho somente nos pacientes com infecção, encontramos maiores valores de cfDNA nos pacientes com quadro mais brando da doença, mas que posteriormente evoluíram com um quadro mais grave. Algumas limitações foram ausência de dados no prontuário médico que poderiam aumentar o valor do  $n$ ; ausência da pró-calcitonina, biomarcador utilizado em estudos anteriores correlacionando-a ao cfDNA.

Como perspectiva, encaminhamos para análise de PCR em tempo real as 124 amostras dosadas por fluorescência, 83 amostras não analisadas por nenhum método, e 80 controles que incluem pacientes internados por patologia não infecciosa. Também fizemos a coleta de 180 urinas nestes pacientes, que no futuro, poderão ser analisadas para quantificação de cfDNA e sua correlação com IRA.

Apesar do crescente interesse na análise do cfDNA em diferentes campos clínicos, sua aplicabilidade na clínica ainda é incerta. A heterogeneidade entre os vários protocolos para manipulação e análise de amostras de cfDNA é um dos principais obstáculos, e até agora não existe uma padronização dos procedimentos operacionais. Os parâmetros que afetam potencialmente a concentração e a fragmentação do cfDNA compreendem etapas desde a escolha do tubo de coleta de sangue até o processamento do plasma, modalidades de extração e purificação, interpretação dos resultados e condições de armazenamento da amostra (Messaoudi et al, 2013). O desenvolvimento de técnicas e protocolos padronizados abrirá caminho para uso eficaz do cfDNA na prática clínica com o objetivo de facilitar a estratificação de pacientes com sepse e terapêutica adequada.

## 7 CONCLUSÃO

Nossos dados demonstram que o cfDNA foi um preditor independente de gravidade em pacientes sépticos, com concentrações mais elevadas em pacientes com sepse/choque comparadas ao grupo infecção, porém ainda com acurácia inferior ao SOFA pela análise da curva ROC, um escore clínico muito utilizado na prática clínica, inclusive para classificar disfunção de órgão da sepse.

Em uma análise de subgrupo, os pacientes com infecção que evoluíram com pior desfecho (sepse ou choque séptico), apresentam maiores valores de cfDNA colhidos no primeiro dia, em comparação com o grupo infecção que não evoluiu com disfunção de órgão. Este dado, apesar da amostra reduzida, merece ser melhor investigado, já que praticamente não existem relatos na literatura de desfecho nos pacientes com infecção somente.

## REFERÊNCIAS

A HYLAND, Catherine et al. Evaluation of noninvasive prenatal RHD genotyping of the fetus. *Medical Journal of Australia*, [s.l.], v. 191, n. 1, p.21-25, jul. 2009. AMPCo. <http://dx.doi.org/10.5694/j.1326-5377.2009.tb02668.x>.

ALLEN, Darrell et al. Role of Cell-Free Plasma DNA as a Diagnostic Marker for Prostate Cancer. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 1022, n. 1, p.76-80, jun. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1318.013>.

ANGUS, Derek C.; POLL, Tom van Der. Severe Sepsis and Septic Shock. *New England Journal Of Medicine*, [s.l.], v. 369, n. 9, p.840-851, 29 ago. 2013. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra1208623>.

ASHOOR, G. et al. Trisomy 13 detection in the first trimester of pregnancy using a chromosome-selective cell-free DNA analysis method. *Ultrasound In Obstetrics & Gynecology*, [s.l.], v. 41, n. 1, p.21-25, 23 nov. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/uog.12299>.

AUCAMP, Janine et al. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biological Reviews*, [s.l.], v. 93, n. 3, p.1649-1683, 14 abr. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/brv.12413>.

AUTHOR, Corporate. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, [s.l.], v. 69, n. 3, p.89-95, mar. 2001. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>.

AVRIEL, Avital et al. Admission Cell Free DNA Levels Predict 28-Day Mortality in Patients with Severe Sepsis in Intensive Care. *Plos One*, [s.l.], v. 9, n. 6, p.100514-0, 23 jun. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0100514>.

BADER, P et al. Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. *Leukemia*, [s.l.], v. 16, n. 9, p.1668-1672, 30 ago. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2402552>.

BEALE, R. et al. Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): Lessons from an International Sepsis Registry. *Infection*, [s.l.], v. 37, n. 3, p.222-232, 28 abr. 2009. Springer Science and Business Media LLC.<http://dx.doi.org/10.1007/s15010-008-8203-z>.

CALVANO, Steve E. et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature*, [s.l.], v. 437, n. 7061, p.1032-1037, 31 ago. 2005. Springer Nature.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nature03985>.

Caroline S. Henkin, Juliano C, Mateus C Paganella et al. Sepse: uma visão atual. *Scientia Medica*, Porto Alegre, v. 19, n. 3, p. 135-145, jul./set. 2009.

CHAN, Terence; GU, Frank. Early diagnosis of sepsis using serum biomarkers. *Expert Review Of Molecular Diagnostics*, [s.l.], v. 11, n. 5, p.487-496, jun. 2011. Informa UK Limited.  
<http://dx.doi.org/10.1586/erm.11.26>.

CLEMENTI, Anna et al. The Role of Cell-Free Plasma DNA in Critically Ill Patients with Sepsis. *Blood Purification*, [s.l.], v. 41, n. 1-3, p.34-40, 20 out. 2015. S. Karger AG.  
<http://dx.doi.org/10.1159/000440975>.

CLEMENTI, Anna et al. The Role of Cell-Free Plasma DNA in Critically Ill Patients with Sepsis. *Blood Purification*, [s.l.], v. 41, n. 1-3, p.34-40, 20 out. 2015. S. Karger AG.  
<http://dx.doi.org/10.1159/000440975>.

DUPUY, Anne-marie et al. Role of biomarkers in the management of antibiotic therapy: an expert panel review. *Annals Of Intensive Care*, [s.l.], v. 3, n. 1, p.22-0, 2013. Springer Nature.  
<http://dx.doi.org/10.1186/2110-5820-3-22>.

DUPUY, Anne-marie et al. Role of biomarkers in the management of antibiotic therapy: an expert panel review. *Annals Of Intensive Care*, [s.l.], v. 3, n. 1, p.22-29, 2013. Springer Nature.  
<http://dx.doi.org/10.1186/2110-5820-3-22>.

DWIVEDI, Bhakti et al. PhiSiGns: an online tool to identify signature genes in phages and design PCR primers for examining phage diversity. *Bmc Bioinformatics*, [s.l.], v. 13, n. 1, p.0-0, 4 mar. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-13-37>.

DWIVEDI, Dhruva J et al. Prognostic utility and characterization of cell-free DNA in patients with severe sepsis. *Critical Care*, [s.l.], v. 16, n. 4, p.151-161, 2012. Springer Nature.  
<http://dx.doi.org/10.1186/cc11466>.

FLEISCHMANN, Carolin et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *American Journal Of Respiratory And Critical Care*

Medicine, [s.l.], v. 193, n. 3, p.259-272, fev. 2016. American Thoracic Society.  
<http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201504-0781oc>.

FRANK, Mayu O.. Circulating Cell-Free DNA Differentiates Severity of Inflammation. Biological Research For Nursing, [s.l.], v. 18, n. 5, p.477-488, 26 jul. 2016. SAGE Publications.  
<http://dx.doi.org/10.1177/1099800416642571>.

FRÜHBEIS, Carsten et al. Physical exercise induces rapid release of small extracellular vesicles into the circulation. Journal Of Extracellular Vesicles, [s.l.], v. 4, n. 1, p.1-12, jan. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v4.28239>.

GAIESKI, David F. et al. Benchmarking the Incidence and Mortality of Severe Sepsis in the United States\*. Critical Care Medicine, [s.l.], v. 41, n. 5, p.1167-1174, maio 2013. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/ccm.0b013e31827c09f8>.

GALLEY, H.f.. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. British Journal Of Anaesthesia, [s.l.], v. 107, n. 1, p.57-64, jul. 2011. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1093/bja/aer093>.

GARNACHO-MONTERO, Jose et al. Prognostic and diagnostic value of eosinopenia, C-reactive protein, procalcitonin, and circulating cell-free DNA in critically ill patients admitted with suspicion of sepsis. Critical Care, [s.l.], v. 18, n. 3, p.116-0, 2014. Springer Nature.  
<http://dx.doi.org/10.1186/cc13908>.

GARNACHO-MONTERO, Jose et al. Prognostic and diagnostic value of eosinopenia, C-reactive protein, procalcitonin, and circulating cell-free DNA in critically ill patients admitted with suspicion of sepsis. Critical Care, [s.l.], v. 18, n. 3, p.116-0, 2014. Springer Nature.  
<http://dx.doi.org/10.1186/cc13908>.

GEORGESCU, Anca Meda et al. The Relevance of Coding Gene Polymorphisms of Cytokines and Cellular Receptors in Sepsis. The Journal Of Critical Care Medicine, [s.l.], v. 3, n. 1, p.5-11, 1 fev. 2017. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/jccm-2017-0001>.

GIAMARELLOS-BOURBOULIS, Evangelos J.; OPAL, Steven M.. The role of genetics and antibodies in sepsis. Annals Of Translational Medicine, [s.l.], v. 4, n. 17, p.328-328, set. 2016. AME Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2016.08.63>.

GIELIS, E. M. et al. Cell-Free DNA: An Upcoming Biomarker in Transplantation. American Journal Of Transplantation, [s.l.], v. 15, n. 10, p.2541-2551, 16 jul. 2015. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1111/ajt.13387>.

GILLIES, Stephen D.; LO, Kin-ming; WESOLOWSKI, John. High-level expression of chimeric antibodies using adapted cDNA variable region cassettes. *Journal Of Immunological Methods*, [s.l.], v. 125, n. 1-2, p.191-202, dez. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90093-8](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(89)90093-8).

GOLDENBERG, N. M. et al. Broken Barriers: A New Take on Sepsis Pathogenesis. *Science Translational Medicine*, [s.l.], v. 3, n. 88, p.0-0, 22 jun. 2011. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3002011>.

GOLDSHTEIN, H.; HAUSMANN, M. J; DOUVDEVANI, A.. A rapid direct fluorescent assay for cell-free DNA quantification in biological fluids. *Annals Of Clinical Biochemistry*, [s.l.], v. 46, n. 6, p.488-494, 3 set. 2009. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1258/acb.2009.009002>.

GOODWIN, Andrew J. et al. Frequency, Cost, and Risk Factors of Readmissions Among Severe Sepsis Survivors\*. *Critical Care Medicine*, [s.l.], v. 43, n. 4, p.738-746, abr. 2015. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/ccm.0000000000000859>.

HAJJ, Jihane et al. The “Centrality of Sepsis”: A Review on Incidence, Mortality, and Cost of Care. *Healthcare*, [s.l.], v. 6, n. 3, p.90-0, 30 jul. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/healthcare6030090>.

HOTCHKISS, Richard S.; MOLDAWER, Lyle L.; VINCENT, Jean-louis. Sepsis and septic shock. *Nature Reviews Disease Primers*, [s.l.], v. 2, n. 1, p.0-0, 30 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2016.46>.

HUTTUNEN, Reetta et al. Fatal Outcome in Bacteremia is Characterized by High Plasma Cell Free DNA Concentration and Apoptotic DNA Fragmentation: A Prospective Cohort Study. *Plos One*, [s.l.], v. 6, n. 7, p.0-0, 1 jul. 2011. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0021700>.

IWASHYNA, Theodore J. et al. Identifying Patients With Severe Sepsis Using Administrative Claims. *Medical Care*, [s.l.], v. 52, n. 6, p.39-43, jun. 2014. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/mlr.0b013e318268ac86>.

IWASHYNA, Theodore J. et al. Population Burden of Long-Term Survivorship After Severe Sepsis in Older Americans. *Journal Of The American Geriatrics Society*, [s.l.], v. 60, n. 6, p.1070-1077, 29 maio 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1532-5415.2012.03989.x>.

Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD and Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*, 61,1659–1665, 2001.

JIANG, Peiyong; LO, Y.m. Dennis. The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. *Trends In Genetics*, [s.l.], v. 32, n. 6, p.360-371, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2016.03.009>.

KANG, Ha Eun; PARK, Dae Won. Lactate as a Biomarker for Sepsis Prognosis? *Infection & Chemotherapy*, [s.l.], v. 48, n. 3, p.252-0, 2016. Korean Society of Infectious Diseases and Korean Society for Chemotherapy (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.3947/ic.2016.48.3.252>.

KAUKONEN, Kirsi-maija et al. Mortality Related to Severe Sepsis and Septic Shock Among Critically Ill Patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *Jama*, [s.l.], v. 311, n. 13, p.1308-1316, 2 abr. 2014. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2014.2637>.

KIM, Hwan Il; PARK, Sunghoon. Sepsis: Early Recognition and Optimized Treatment. *Tuberculosis And Respiratory Diseases*, [s.l.], v. 82, n. 1, p.6-0, 2019. The Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Diseases (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.4046/trd.2018.0041>.

KORABECNA, Marie et al. Cell-Free Plasma DNA during Peritoneal Dialysis and Hemodialysis and in Patients with Chronic Kidney Disease. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 1137, n. 1, p.296-301, ago. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1448.014>.

KUSTANOVICH, Anatoli et al. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biology & Therapy*, [s.l.], v. 20, n. 8, p.1057-1067, 16 abr. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15384047.2019.1598759>.

LEE, Daniel W. et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood*, [s.l.], v. 124, n. 2, p.188-195, 10 jul. 2014. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-05-552729>.

LOBO, Suzana Margareth et al. Mortality due to sepsis in Brazil in a real scenario: the Brazilian ICUs project. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, [s.l.], v. 31, n. 1, p.0-0, 2019. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/0103-507x.20190008>.

LOBO, Suzana Margareth et al. Mortality due to sepsis in Brazil in a real scenario: the Brazilian ICUs project. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, [s.l.], v. 31, n. 1, p.31-34, 2019. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/0103-507x.20190008>.

LU, Jun-liang; LIANG, Zhi-yong. Circulating free DNA in the era of precision oncology: Pre- and post-analytical concerns. *Chronic Diseases And Translational Medicine*, [s.l.], v. 2, n. 4, p.223-230, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cdtm.2016.12.001>.

MACHADO, Flavia R et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. *The Lancet Infectious Diseases*, [s.l.], v. 17, n. 11, p.1180-1189, nov. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(17\)30322-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30322-5).

MACHADO, Flavia R et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. *The Lancet Infectious Diseases*, [s.l.], v. 17, n. 11, p.1180-1189, nov. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(17\)30322-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30322-5).

MACHADO, Flavia R. et al. Quality Improvement Initiatives in Sepsis in an Emerging Country. *Critical Care Medicine*, [s.l.], v. 45, n. 10, p.1650-1659, out. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/ccm.0000000000002585>.

MALAPELLE, Umberto et al. Development of a gene panel for next-generation sequencing of clinically relevant mutations in cell-free DNA from cancer patients. *British Journal Of Cancer*, [s.l.], v. 116, n. 6, p.802-810, 7 fev. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2017.8>.

Mandel P, Metais P. Les Acides Nucleiques Du Plasma Sanguin Chez L'Homme. *P. C R Acad Sci Paris*, 142:241–243, 1948

MARSHALL, John C.; REINHART, Konrad. Biomarkers of sepsis. *Critical Care Medicine*, [s.l.], v. 37, n. 7, p.2290-2298, jul. 2009. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/ccm.0b013e3181a02afc>.

MARTIN, Greg S. et al. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New England Journal Of Medicine*, [s.l.], v. 348, n. 16, p.1546-1554, 17 abr. 2003. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa022139>.

MCCORMICK, Allison et al. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes And Infection*, [s.l.], v. 12, n. 12-13, p.928-936, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2010.06.009>.

MESSAOUDI, Safia El et al. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clinica Chimica Acta*, [s.l.], v. 424, p.222-230, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2013.05.022>.

MESSAOUDI, Safia El et al. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clinica Chimica Acta*, [s.l.], v. 424, p.222-230, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2013.05.022>.

- MIRA, Juan C. et al. Sepsis Pathophysiology, Chronic Critical Illness, and Persistent Inflammation-Immunosuppression and Catabolism Syndrome. *Critical Care Medicine*, [s.l.], v. 45, n. 2, p.253-262, fev. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/ccm.0000000000002074>.
- MONDOVI', Bruno et al. The biochemical mechanism of selective heat sensitivity of cancer cells. *European Journal Of Cancer* (1965), [s.l.], v. 5, n. 2, p.137-146, maio 1969. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-2964\(69\)90060-7](http://dx.doi.org/10.1016/0014-2964(69)90060-7).
- MORAN, John L.; SANTAMARIA, John. Reconsidering lactate as a sepsis risk biomarker. *Plos One*, [s.l.], v. 12, n. 10, p.0185320-0, 3 out. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0185320>.
- MOREIRA, V. G. et al. Usefulness of cell-free plasma DNA, procalcitonin and C-reactive protein as markers of infection in febrile patients. *Annals Of Clinical Biochemistry*, [s.l.], v. 47, n. 3, p.253-258, 26 abr. 2010. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1258/acb.2010.009173>.
- MORELLO, Luis Gustavo et al. Assessment of clinical and epidemiological characteristics of patients with and without sepsis in intensive care units of a tertiary hospital. *Einstein (são Paulo)*, [s.l.], v. 17, n. 2, p.0-0, 2019. Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Hospital Albert Einstein. [http://dx.doi.org/10.31744/einstein\\_journal/2019ao4476](http://dx.doi.org/10.31744/einstein_journal/2019ao4476).
- ONYENEKWU, Chinelo P; OKWUNDU, Charles I; A OCHODO, Eleanor. Procalcitonin, C-reactive protein, and presepsin for the diagnosis of sepsis in adults and children. *Cochrane Database Of Systematic Reviews*, [s.l.], p.0-0, 5 abr. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd012627>.
- PALOMAKI, G. E. et al. Circulating cell free DNA testing: are some test failures informative?. *Prenatal Diagnosis*, [s.l.], v. 35, n. 3, p.289-293, 8 jan. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pd.4541>.
- PAN, W. et al. Association between interleukin-10 polymorphisms and sepsis: a meta-analysis. *Epidemiology And Infection*, [s.l.], v. 143, n. 2, p.366-375, 17 abr. 2014. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0950268814000703>.
- PENA, Olga M. et al. An Endotoxin Tolerance Signature Predicts Sepsis and Organ Dysfunction at Initial Clinical Presentation. *Ebiomedicine*, [s.l.], v. 1, n. 1, p.64-71, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2014.10.003>.
- PHILLIPSON, Mia; KUBES, Paul. The neutrophil in vascular inflammation. *Nature Medicine*, [s.l.], v. 17, n. 11, p.1381-1390, nov. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2514>.

PIERRAKOS, Charalampos; VINCENT, Jean-louis. Sepsis biomarkers: a review. *Critical Care*, [s.l.], v. 14, n. 1, p.15-32, 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/cc8872>.

PILSCZEK, Florian H. et al. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. *The Journal Of Immunology*, [s.l.], v. 185, n. 12, p.7413-7425, 22 nov. 2010. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1000675>.

PRESCOTT, Hallie C. et al. Increased 1-Year Healthcare Use in Survivors of Severe Sepsis. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*, [s.l.], v. 190, n. 1, p.62-69, jul. 2014. American Thoracic Society. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201403-0471oc>.

PRESCOTT, Hallie C.; ANGUS, Derek C.. Enhancing Recovery From Sepsis. *Jama*, [s.l.], v. 319, n. 1, p.62-75, 2 jan. 2018. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2017.17687>.

PRESCOTT, Hallie C.; LANGA, Kenneth M.; IWASHYNA, Theodore J.. Readmission Diagnoses After Hospitalization for Severe Sepsis and Other Acute Medical Conditions. *Jama*, [s.l.], v. 313, n. 10, p.1055-1057, 10 mar. 2015. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2015.1410>.

REVELLO, R. et al. Screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood: consequences of a failed result. *Ultrasound In Obstetrics & Gynecology*, [s.l.], v. 47, n. 6, p.698-704, 25 abr. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/uog.15851>.

RHODES, Andrew et al. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Critical Care*, [s.l.], v. 10, n. 2, p.60-66, 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/cc4894>.

RHODES, Andrew et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock. *Intensive Care Medicine*, [s.l.], v. 43, n. 3, p.304-377, 18 jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-017-4683-6>.

Rodrigo S. Batista, Andréia P. Gomes, Larissa C. Lima et al, Sepse: atualidades e perspectivas, *Rev Bras Ter Intensiva*, 23(2):207-216, 2011.

RUSSELL, James A.; WALLEY, Keith R.. Update in Sepsis 2012. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*, [s.l.], v. 187, n. 12, p.1303-1307, 15 jun. 2013. American Thoracic Society. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201303-0567up>.

RYOO, Seung Mok et al. The usefulness of C-reactive protein and procalcitonin to predict prognosis in septic shock patients: A multicenter prospective registry-based observational

study. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 9, n. 1, p.0-0, 29 abr. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-42972-7>.

SAKR, Yasser et al. Sepsis in Intensive Care Unit Patients: Worldwide Data From the Intensive Care over Nations Audit. *Open Forum Infectious Diseases*, [s.l.], v. 5, n. 12, p.0-0, 19 nov. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ofid/ofy313>.

S. A. Leon, B. Shapiro, D. M. Sklaroff and M. J. Yaros. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Res*, (37) (3) 646-650; March 1977.

SALOMÃO, R. et al. Sepsis: evolving concepts and challenges. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, [s.l.], v. 52, n. 4, p.0-0, 15 abr. 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20198595>.

SAUKKONEN, K. et al. Cell-Free Plasma DNA as a Predictor of Outcome in Severe Sepsis and Septic Shock. *Clinical Chemistry*, [s.l.], v. 54, n. 6, p.1000-1007, 10 abr. 2008. American Association for Clinical Chemistry (AACC). <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2007.101030>.

SAUKKONEN, Katri et al. Association of cell-free plasma DNA with hospital mortality and organ dysfunction in intensive care unit patients. *Intensive Care Medicine*, [s.l.], v. 33, n. 9, p.1624-1627, 31 maio 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-007-0686-z>.

SCHERMERHORN, Marc. Endovascular Aortic Aneurysm Repair—Reply. *Jama*, [s.l.], v. 303, n. 11, p.1035-1794, 17 mar. 2010. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2010.155>.

SCHMIDT, B.. Improved Method for Isolating Cell-Free DNA. *Clinical Chemistry*, [s.l.], v. 51, n. 8, p.1561-1563, 1 ago. 2005. American Association for Clinical Chemistry (AACC). <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2005.051003>.

SHANKAR-HARI, Manu et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock. *Jama*, [s.l.], v. 315, n. 8, p.775-787, 23 fev. 2016. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2016.0289>.

SHIFERAW, Bethel. The Role of Procalcitonin as a Biomarker in Sepsis. *Journal Of Infectious Diseases And Epidemiology*, [s.l.], v. 2, n. 1, p.0-0, 30 abr. 2016. ClinMed International Library. <http://dx.doi.org/10.23937/2474-3658/1510006>.

SIDSTEDT, Maja et al. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, [s.l.], v. 410, n. 10, p.2569-2583, 5 mar. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-018-0931-z>.

SILVA, Eliézer et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Critical Care*, [s.l.], v. 8, n. 4, p.251-260, 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/cc2892>.

SINGER, Mervyn et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*, [s.l.], v. 315, n. 8, p.801-810, 23 fev. 2016. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2016.0287>.

SNYDER, Matthew w. et al. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell*, [s.l.], v. 164, n. 1-2, p.57-68, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.050>.

STEVENSON, Elizabeth K. et al. Two Decades of Mortality Trends Among Patients With Severe Sepsis. *Critical Care Medicine*, [s.l.], v. 42, n. 3, p.625-631, mar. 2014. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/ccm.0000000000000026>.

STROUN, M et al. About the possible origin and mechanism of circulating DNA. *Clinica Chimica Acta*, [s.l.], v. 313, n. 1-2, p.139-142, nov. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0009-8981\(01\)00665-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0009-8981(01)00665-9).

TAGLAUER, E.s.; WILKINS-HAUG, L.; BIANCHI, D.w.. Review: Cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease. *Placenta*, [s.l.], v. 35, p.64-68, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2013.11.014>.

TANIGUCHI, Takumi; SATO, Koji; OKAJIMA, Masaki. 1440. *Critical Care Medicine*, [s.l.], v. 46, p.704-0, jan. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/01.ccm.0000529442.73627.f6>.

TORIO, Celeste Marie et al. Annual Report on Health Care for Children and Youth in the United States: National Estimates of Cost, Utilization and Expenditures for Children With Mental Health Conditions. *Academic Pediatrics*, [s.l.], v. 15, n. 1, p.19-35, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acap.2014.07.007>.

T Tsumita, M Iwanaga. Fate of injected deoxyribonucleic acid in mice. *Nature*, 198, pp. 1088-1089, 1963.

VAART, M. van Der; PRETORIUS, P. J.. The Origin of Circulating Free DNA. *Clinical Chemistry*, [s.l.], v. 53, n. 12, p.2215-2215, 5 out. 2007. American Association for Clinical Chemistry (AACC). <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2007.092734>.

VAN ENGELEN, Tjitske S.r. et al. Biomarkers in Sepsis. *Critical Care Clinics*, [s.l.], v. 34, n. 1, p.139-152, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2017.08.010>.

VINCENT, Jean-louis. The Prevalence of Nosocomial Infection in Intensive Care Units in Europe. *Jama*, [s.l.], v. 274, n. 8, p.639-644, 23 ago. 1995. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1995.03530080055041>.

WARD, Peter A.. New approaches to the study of sepsis. *Embo Molecular Medicine*, [s.l.], v. 4, n. 12, p.1234-1243, dez. 2012. EMBO. <http://dx.doi.org/10.1002/emmm.201201375>.

WONG, Hector R. et al. Prospective Testing and Redesign of a Temporal Biomarker Based Risk Model for Patients With Septic Shock: Implications for Septic Shock Biology. *Ebiomedicine*, [s.l.], v. 2, n. 12, p.2087-2093, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.11.035>.