



**Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Fernandes Figueira  
Pós-Graduação em Saúde da Criança e da Mulher**

**SEPSE NEONATAL:  
O IMPACTO DA DIVERSIDADE GENÉTICA NA EVOLUÇÃO CLÍNICA  
E SUA APLICABILIDADE NA PREVENÇÃO DA MORTALIDADE EM  
RECÉM-NASCIDOS VULNERÁVEIS**

**Juliana Killesse Carvalho**

**Rio de Janeiro  
Abril de 2012**



**Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Fernandes Figueira  
Pós-Graduação em Saúde da Criança e da Mulher**

**SEPSE NEONATAL:  
O IMPACTO DA DIVERSIDADE GENÉTICA NA EVOLUÇÃO CLÍNICA  
E SUA APLICABILIDADE NA PREVENÇÃO DA MORTALIDADE EM  
RECÉM-NASCIDOS VULNERÁVEIS**

Dissertação apresentada à Pós-Graduação em Saúde da Criança e da Mulher, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Maria Ignez Capella Gaspar Elsas M.D., Ph.D.

Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup> Daniella Campelo Batalha Cox Moore M.D., Ph.D.

**Rio de Janeiro  
Abril de 2012**

**FICHA CATALOGRÁFICA NA FONTE  
INSTITUTO DE COMUNICAÇÃO E INFORMAÇÃO  
CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA EM SAÚDE  
BIBLIOTECA DA SAÚDE DA MULHER E DA CRIANÇA**

C331s Carvalho, Juliana Killesse

Sepse neonatal: o impacto da diversidade genética na evolução clínica e sua aplicabilidade na prevenção da mortalidade em recém-nascidos vulneráveis / Juliana Killesse Carvalho. – 2012.  
145 f. ; il.; tab. ; fig.

Dissertação (Mestrado em Saúde da Mulher e da Criança) – Instituto Fernandes Figueira, Rio de Janeiro, R J, 2012.

Orientador: Maria Ignez Capella Gaspar Elsas  
Co-Orientador: Daniella Campelo Batalha Cox Moore

Bibliografia: f. 129 – 145.

1. Sepses. 2. Neonatos. 3. Citocinas. 4. Polimorfismo. I. Título.

CDD - 22ª ed. 618.92011

## DEDICATÓRIA

À minha mãe Nadja cuja sabedoria é o reflexo da experiência que a vida proporcionou no dia-a-dia sempre cheio de obstáculos. À que tem o maior orgulho de dizer que sua filha será mestre; que enxerga meus defeitos, mas potencializa minhas qualidades; que também tem a humildade de mãe ao se realizar no sucesso da filha, e nunca pára de alimentar meu crescimento.

Aos meus pais, pela minha formação e construção da pessoa que sou hoje.

À minha família que me acolhem e amam de forma tão especial em suas vidas e, que compreenderam a minha ausência em certos momentos.

Ao meu amigo, companheiro e amado Ricardo, em seu apoio e incentivo na realização de nossos projetos e sonhos.

Dedico esta investigação a todos os profissionais de saúde que diariamente cuidam e acolhem bebês, tentando minimizar a dor, acabar com a doença e salvar vidas humanas.

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Fernandes Figueira, que me permitiu conhecer e despertar o interesse pela pesquisa acadêmica de qualidade.

À Maria Ignez Elsas, minha orientadora, pela confiança, compreensão e ensinamentos transmitidos ao longo desse período; pela amizade, sem deixar de ser firme em alguns momentos durante esses dois anos, com quem aprendi, muito mais do que ser pesquisadora, muito mais do que ser um melhor profissional... com quem as longas horas de orientação me transformaram em um ser mais humano ... um ser humano bem melhor! E, principalmente, por ter permitido transformar meu grande sonho em realidade.

À Daniella Moore, minha co-orientadora, pelo apoio, por apontar as direções corretas e na resolução das dúvidas tantas. Pela parceria no projeto, disponibilidade que me proporcionou e apoio estatístico indispensável na concretização deste trabalho .

Ao Ricardo Luz pela atenção pela compreensão, dedicação e apoio nos momentos mais difíceis.

Ao Pedro Paulo Elsas pelo acolhimento, conhecimento transmitido e pela oportunidade de aprender sempre mais.

À Maria Elizabeth Lopes que contribuiu de forma construtiva para o melhor desenvolvimento do trabalho.

À Zina Maria de Azevedo e ao João Henrique Leme que, sem a ajuda destes seria impossível a avaliação dos dados clínicos desse estudo.

À todos os pacientes e familiares que autorizaram a pesquisa visando a melhorar a qualidade de vida de outras pessoas.

Aos funcionários do arquivo médico do Instituto Fernandes Figueira que contribuíram nas preciosas coletas dos dados de prontuários analisados em nosso trabalho

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram tornando possível a finalização desta obra.

Por último, mas não menos importante, agradeço aos meus amigos, colegas de curso de pós graduação e alunos do laboratório, com quem compartilhei experiências e vivências. E a todos os professores que comigo partilharam do seu saber.

**LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AT	a termo
BAR	Berçário de Alto Risco
BP	Baixo peso ao nascer
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIPe	Cirurgia Pediátrica
CIVD	Coagulação Intravascular Disseminada
CVC	Cateter venoso central
DMOS	Disfunção de Múltiplos Órgãos e Sistemas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvios-Padrão
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
EBP	Extremo baixo peso ao nascer
EUA	Estados Unidos da América
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
G	Guanina
GBS	<i>Streptococcus agalactiae</i> do Grupo B
HLA ou MHC	Antígeno Leucocitário Humano ou Complexo Principal de Histocompatibilidade
IC 95%	Intervalos de Confiança 95%
IFF	Instituto Fernandes Figueira
IL	Interleucina

IL-1ra	Antagonista do Receptor de Interleucina-1
IPCS	Infecção primária da corrente sanguínea
IRAS	Infecções relacionadas à Saúde
LBW	<i>Low birth weight</i> -Recém nascido de baixo peso ao nascer
LPS	Lipopolissacarídeo
LRM	<i>Logistic Regression Model</i> – Modelo Regressão Logística
LT- $\alpha$ ou TNF- $\beta$	Linfotoxina-Alfa
LTB ou LT- $\beta$	Linfotoxina-Beta
LT- $\beta$ R ou LTBR	Receptores de Linfotoxina-Beta
LTA	Gene responsável pela Linfotoxina-Alfa
MBL	Lectina Ligadora de Manose
MHC ou HLA	Complexo Principal de Histocompatibilidade ou Antígeno Leucocitário Humano
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de Mercúrio
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
<i>NcoI</i>	Enzima de Restrição <i>NcoI</i>
OR	<i>Odds Ratio</i> – Razão de Chances
p	p-valor
PAF	Fator de Ativação Plaquetário
pb	Pares de Base
PIG	Pequeno para idade gestacional
PMT	Prematuros
RN	Recém nascido
RNapol	RNA Polimerase
RR	Risco relativo
rs	<i>Reference SNP</i> – Polimorfismo de Base Única    Referência

RN	Recém-nascidos
SCN	<i>Streptococcus</i> Coagulase negativa
SEL	Selectina
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> – Polimorfismos de Base Única
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformante do tipo beta
TNF ou TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
TNF	Gene responsável pelo Fator de Necrose Tumoral
<i>TNFB1</i>	Alelo LTA +252 G
<i>TNFB2</i>	Alelo LTA +252 A
TNFR1	Receptor de Fator de Necrose Tumoral do tipo 1
TNFR2	Receptor de Fator de Necrose Tumoral do tipo 2
UPG	Unidade de Pacientes Graves / IFF
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
$\chi^2$	Teste do Qui-Quadrado de <i>Pearson</i>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> → Fatores de Risco para o Desenvolvimento de Sepsis Neonatal -----	30
<b>Tabela 2</b> → Sinais Clínicos e Sintomas para o Diagnóstico de Sepsis Neonatal ----	36
<b>Tabela 3</b> → Escore Hematológico de Rodwell -----	37
<b>Tabela 4</b> → Estudos selecionados para análise integral dos dados -----	82
<b>Tabela 5</b> → Estudos de associação entre diversos SNPs e Sepsis neonatal -----	83
<b>Tabela 6</b> → Diferenças em características clínicas e demográficas entre crianças nascidas a termo e pré termo -----	103
<b>Tabela 7</b> → Frequências de genótipos e alelos para SNPs com ou sem sepsis na população total do estudo -----	109
<b>Tabela 8</b> → Frequências de genótipos e alelos para SNPs na sepsis somente entre os prematuros -----	110

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> → N° de óbitos infantis segundo grupo etário no ano de 2011 -----	26
<b>Gráfico 2</b> → N° de óbitos neonatais precoces evitáveis, em função da forma de prevenção em 2011 -----	27
<b>Gráfico 3</b> → N° de óbitos redutíveis por ações de Promoção à Saúde nas Ações de Atenção na faixa etária neonatal no ano de 2011-----	27
<b>Gráfico 4</b> → Desenho de Estudo da Pesquisa -----	74
<b>Gráfico 5</b> → Diagnósticos de Mal formação Congênita observadas na população do estudo -----	105

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1** → Diagnóstico de Sepsis Neonatal e sua origem -----34
- Figura 2** → Diagrama da resposta imune inata à infecção e a injúria tecidual envolvendo citocinas inflamatórias e a cascata de coagulação ----- 45
- Figura 3** → O Sistema HLA ----- 47
- Figura 4** → Interações entre os genes TNF e LTA -----51
- Figura 5** → Fluxograma Busca da Revisão Sistemática ----- 81
- Figura 6** → Diagrama de Interações na Sepsis Neonatal -----126

## RESUMO

A mortalidade infantil tem sofrido um declínio principalmente no componente pós-neonatal, que é mais susceptível às ações preventivas, como campanhas de vacinação, estímulo ao aleitamento materno e controle da doença diarreica. A mortalidade neonatal, por outro lado, resulta de uma estreita e complexa relação entre variáveis biológicas, imunológicas, sociais e de assistência à saúde, o que faz com que a redução seja mais difícil e lenta.

Avanços recentes em estudos genômicos vêm buscando identificar a correlação entre polimorfismos genéticos de base única (SNPs) em genes reguladores da resposta inflamatória sistêmica e a suscetibilidade à sepse.

Neste estudo, foram avaliados os polimorfismos de base única nas posições TNF-308 G>A ; TNF-863 ; IL-6-174; LTA+252 ; MIF-173; IL-10- 819 em relação à gravidade de evolução clínica na sepse na população neonatal.

Trata-se de um estudo retrospectivo com 58 crianças nascidas na maternidade no IFF, gravemente enfermas admitidas em UTI Pediátrica (UPG) e história pregressa de internação em UTI Neonatal (BAR e Neocirúrgica IFF/Fiocruz) com ou sem diagnóstico de sepse no período neonatal.

A genotipagem de todos foi disponibilizada em banco de dados existente e resultados foram comparados com dados da evolução clínica desses pacientes no período neonatal através de medidas de associação regressão logística, sendo ajustadas co-variáveis.

Foi observada diferença estatisticamente significativa na distribuição de sepse neonatal entre crianças nascidas a termo e pré termo, o predomínio de sepse neonatal no grupo de menor peso ao nascer e a presença de fatores nosocomiais como necessidade de acesso profundo, uso de nutrição parenteral e permanência em ventilação mecânica invasiva apresentaram associação estatisticamente significativa entre tais fatores e o desenvolvimento de sepse neonatal .

Não foi observada associação estatisticamente significativa na análise dos genótipos, alelos e carreadores dos polimorfismos nas posições TNF-308 G>A , LTA+252, IL-6-174, TNF-863, IL-10-819 e MIF-173 e o desenvolvimento de sepse neonatal na população estudada, nem na população estratificada por prematuridade.

A dificuldade em identificar uma associação entre o desfecho e polimorfismos nessas citocinas é compatível com os resultados da literatura especializada, revistos em detalhe a partir de uma revisão sistemática do assunto. Juntos, os nossos dados indicam que as análises dessas associações já podem ser feitas em nossa instituição, mas que ainda não é possível definir um painel de biomarcadores que possa ser implementado rotineiramente como ferramenta prognóstica para a sepse neonatal.

## ABSTRACT

Infant mortality is decreasing, especially in the post-neonatal age group, which is more amenable to preventive measures, such as vaccination, stimulation of breastfeeding and control of diarrheal disease transmission. Neonatal mortality, by contrast, results from a close and complex relationship between biological, immunological, social and health care factors, which makes the efforts to achieve reduction in disease both time- and labour-intensive.

Recent progress in genomic studies have focussed on the correlation between single nucleotide polymorphisms (SNP) affecting genes relevant to the systemic inflammatory response and susceptibility to sepsis.

In this study, we evaluated SNP in the positions TNF- $\alpha$ -308; TNF- $\alpha$  -863; IL-6 -174; LTA +252; MIF -173; and IL-10 -819, for their impact on the risk of sepsis and clinical evolution of sepsis in neonates.

Ours is a retrospective study of 58 children born in Instituto Fernandes Figueira, which due to serious disease were admitted in the Pediatric Intensive Care Unit of the same institute, and who had a history of admission in Neonatal Intensive Care Units of the same institution. All children could be classified as either having presented neonatal sepsis or having excluded neonatal sepsis as a diagnosis during their passage in the neonatal ICU.

Genotypic data were obtained from the pediatric ICU data bank, and the results were compared with data from the clinical evolution of these patients in the neonatal period through measures of logistic regression, after adjustment for co-variables.

We observed statistically significant differences in the distribution of neonatal sepsis between term and preterm newborns; a predominance of neonatal sepsis in the group of low birth weight newborns; and the influence of nosocomial factors, including the need for deep venous access, use of parenteral nutrition, and length of invasive mechanical ventilation, which were significantly associated with neonatal sepsis.

By contrast, we did not observe statistically significant association between genotypes, alleles or carriers of polymorphisms in positions TNF-308 G>A, LTA +252, IL-6 -174, TNF -863, IL-10 -819 and MIF -173 and the development of neonatal sepsis in our study population, even after stratification into term and preterm infants.

Our difficulty in identifying an association between the outcome of interest and polymorphisms in these cytokine genes is consistent with results from the specialized literature, which were reviewed in detail on the basis of a systematic review of publications up to January 2012. Together, our results from reviewing published studies and patient data show that genomic association studies can be carried out in our institution, but it is not yet possible to define a panel of SNP that can be routinely applied as a prognostic tool in neonatal sepsis.

## SUMÁRIO

1. Introdução -----	15
2. Justificativa -----	19
3. Referencial Teórico -----	25
3.1 Infecções Neonatais -----	25
3.1.1 Epidemiologia das Infecções Neonatais -----	27
3.1.2 Fatores de Risco para Sepses Neonatal -----	30
3.1.3 Diagnóstico de Sepses Neonatal -----	31
3.2 Imunologia Neonatal -----	38
3.3 Polimorfismo Genético e Sepses -----	40
3.3.1 Fator de Necrose Tumoral e <i>TNF-308 G&gt;A</i> -----	45
3.3.2 Linfotóxina $\alpha$ - e LTA+252 -----	51
3.3.3 IL-1 e <i>IL-1ra</i> -----	53
3.3.4 Interleucina-6 e <i>IL-6-174</i> -----	53
3.3.5 Interleucina-10 e <i>IL-10-1082</i> -----	55
3.3.6 <i>CD-14</i> e <i>TLR-4</i> , e seus SNPs -----	56
3.3.7 Enzima Conversora de Angiotensina e ECA I/D -----	57
3.3.8 PAI-1-----	59
3.3.9 Lectina Ligadora de Manose (MBL) -----	60
3.3.10 Selectina e Polimorfismo -----	61
3.4 Implicações na Prática Médica -----	62
4. Hipótese do Estudo e Objetivos -----	68
5. Metodologia -----	69
5.1 Natureza e Contexto Institucional da Pesquisa-----	69
5.2 Revisão Sistemática da Literatura -----	70

5.2.1 Busca dos estudos primários -----	71
5.2.2 Seleção dos Estudos com base nos critérios de inclusão e exclusão -----	70
5.2.3 Avaliação da qualidade dos Estudos incluídos -----	72
5.2.4 Análise e Interpretação dos Dados -----	74
5.3 Estudos de Pacientes -----	73
5.3.1 Local de Realização do Estudo -----	71
5.3.2 Desenho do Estudo -----	73
5.3.3 Classificação Demográfica dos Pacientes Incluídos -----	75
5.3.4 Classificação Clínica dos Pacientes -----	75
5.3.5 Variáveis Analisadas -----	76
5.4 Análise Estatística -----	77
5.5 Análise pelo Comitê de Ética-----	79
6. Resultados -----	80
6.1 Revisão Sistemática da Literatura -----	80
6.2 Estudo de Pacientes -----	103
7. Discussão -----	111
8. Conclusões -----	126
9. Considerações Finais -----	128
10. Referências -----	129

## INTRODUÇÃO

Os avanços científicos e tecnológicos das duas últimas décadas, permitiram grandes mudanças na assistência obstétrica e neonatal, destacando-se o incremento no uso de corticóide antenatal e a terapia de reposição de surfactante no recém-nascido prematuro, intervenções estas cujo benefício na redução da mortalidade neonatal é inquestionável.

Em contrapartida, o aumento nas taxas de sobrevivência de recém-nascidos (RN) de idade gestacional e de pesos extremamente baixos ao nascer, explica a persistência de altas taxas de mortalidade por infecções.

Os neonatos são mais susceptíveis às infecções, devido à imaturidade do seu sistema imunológico e, dependendo do tipo de invasão a que são expostos nos primeiros dias de vida, o risco de infecção se eleva.

Assim, tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, houve na década de 90 um significativo aumento nas taxas de sobrevida de prematuros de muito baixo peso, especialmente nos menores de 1.000 gramas, ou seja, de extremo baixo peso (EBP)<sup>1,2</sup>. Além disso, a taxa de sepse nosocomial aumenta de forma inversamente proporcional ao peso de nascimento e à idade gestacional<sup>3</sup>.

Ao final da década de 90 nos Estados Unidos da América, a expectativa de sobrevida para prematuros de 750-1.000 g e de 500-749 g, situava-se em torno de 85% e 45%, respectivamente; enquanto no Brasil, a Rede Brasileira de Pesquisas Neonatais mostrava, nesta época, sobrevida de 66-73% e 9-44% na faixa de 750-1.000 g e 500-749g de peso ao nascer, respectivamente<sup>1,2</sup>.

Os óbitos infantis tendem a concentrar-se no período neonatal, sobretudo durante a primeira semana de vida. Na última década, houve uma redução acentuada na mortalidade infantil no Brasil, de 39,5% (1994) para 26,6% em 2004, que ocorreu principalmente no componente pós-neonatal<sup>4</sup>. Esse perfil reflete a melhoria das condições de vida e a implementação de ações básicas de proteção da saúde infantil, reduzindo principalmente a mortalidade associada a fatores ambientais.

Dados do Sistema Único de Saúde do Brasil mostram que cerca de 70% dos óbitos infantis em 2011 ocorreram no período neonatal. Além disso, 49% dentre todos os óbitos infantis foram atribuídos à causas evitáveis<sup>5</sup>. Neste mesmo ano, foram devidos à atenção inadequada ao RN, levando a altas taxas de mortalidade por doenças infecciosas em crianças prematuras.

Um aspecto relevante é que as taxas de reinternação hospitalar, mesmo no final da infância, permanecem elevadas, sugerindo consequências imunológicas e fisiológicas generalizadas relacionadas à prematuridade<sup>6</sup>.

A hospitalização da criança, na maioria das vezes, representa um problema complexo para a estrutura familiar, além de acarretar um custo financeiro para o sistema de saúde, tanto público como privado. O período em que a criança está internada em um hospital, geralmente acompanhada da mãe, pode significar, por exemplo, o abandono do lar e dos demais filhos.

Segundo relatório emitido pela Organização das Nações Unidas (ONU) em 2004, a respeito da prospecção da população mundial, a mortalidade para menores de cinco anos no Brasil, no período de 1995 a 2000, foi de 44,6 para cada 1000 nascidos vivos e a estimativa para 2010 a 2015 é de 26,1 para cada 1000 nascidos vivos<sup>7</sup>.

A prevalência de sepse e meningite tem sido estimada no Brasil em várias populações de recém-nascidos, variando de 1 a 5/1.000 nascidos vivos. Entretanto, no

premature, estima-se que essa prevalência seja tão elevada quanto 4/1000 recém-nascidos, sendo a sepse mais frequentemente encontrada nesse grupo de crianças<sup>8</sup>.

A sepse neonatal pode ser definida como precoce ou tardia, dependendo da etiologia e do tempo decorrido, desde o nascimento até o início do aparecimento de alterações clínicas e/ou laboratoriais.

A infecção nos recém-nascidos que ocorrem dentro da primeira semana de vida é classificada como sepse precoce, e após a primeira semana de vida até os 3 meses como tardia<sup>9</sup>.

É importante ressaltar que as taxas de infecções no período neonatal são definidas como causas evitáveis da mortalidade infantil através da atenção à saúde, constituindo-se de um problema de saúde pública.

Os desafios frente ao cuidado e prevenção de insultos e procedimentos invasivos são também influenciados pelas características genéticas individuais que determinam os padrões de resposta à infecção e a abordagem terapêutica relaciona-se a alguns fatores, tais como variabilidade individual, complexidade da resposta imune, conhecimento insuficiente a respeito dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na sepse e ausência de biomarcadores bem estabelecidos.

A identificação de biomarcadores na sepse é de extrema importância, tendo em vista que existe correlação direta entre o prognóstico de uma criança com infecção grave e o tempo decorrido entre o início do quadro e o momento de instituição terapêutica.

Avanços recentes na biologia molecular enfatizando genômica vêm permitindo uma compreensão mais profunda dos processos orgânicos relevantes na sepse. Com o sequenciamento do genoma humano e o reconhecimento do grau de variação genética que existe na população, ficou claro que a carga genética de um indivíduo tem impacto na apresentação da doença, tratamento e evolução clínica<sup>10</sup>. Este conhecimento estimulou

estudos buscando identificar a correlação entre genes polimórficos de citocinas inflamatórias e sepse.

Alguns polimorfismos de base única de genes reguladores da resposta inflamatória vêm sendo associados com evolução grave e mortalidade na sepse e choque séptico em adultos e crianças. Sua genotipagem permite acesso a uma classe de biomarcadores que, se efetivamente validados, podem ser conhecidos precocemente e contribuir para o emprego mais racional de alguns recursos terapêuticos que possam inibir ou estimular a resposta do hospedeiro à infecção e até mesmo antecipar a necessidade de cuidados intensivos, funcionando como marcadores prognósticos de evolução desfavorável<sup>11</sup>.

Sendo assim, o maior desafio proposto é incorporar à prática da Medicina Neonatal o conhecimento delineado na pesquisa clínica, já que avanços no entendimento da fisiologia e da fisiopatologia podem melhorar não só as chances de sobrevivência do recém-nascido, mas a qualidade desta sobrevivência e o futuro desenvolvimento da criança.

## JUSTIFICATIVA

Durante décadas emergiram discussões sobre as relações entre o estado de saúde de uma população e o desenvolvimento econômico. Um dos principais debates na área de saúde se refere à existência, ou não, de uma interdependência entre a melhoria das condições de saúde da população e o aumento equivalente do padrão de vida.

Mortes infantis são mortes precoces e, em sua maioria por razões evitáveis e representam um desfecho indesejável em saúde pública. Portanto, o acesso à saúde e garantia ao atendimento adequado para um nascimento saudável, a promoção do crescimento e desenvolvimento com enfoque prioritário para a vigilância à saúde das crianças de maior risco, são ações para prover qualidade de vida e não podem deixar de ser realizadas em toda a sua plenitude.

A taxa de mortalidade infantil é padronizada internacionalmente, como o número de óbitos de crianças menores de um ano sobre o número de nascidos vivos (multiplicada por 1.000) e esta, indica o risco de um nascido vivo evoluir para o óbito. Tradicionalmente, essa taxa é considerada como um indicador de saúde das populações, sendo utilizada para definição das políticas públicas direcionadas à saúde infantil.

O Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) foi criado originalmente para medir o nível de desenvolvimento humano dos países a partir de indicadores de educação (alfabetização e taxa de matrícula), longevidade (esperança de vida ao nascer) e renda (PIB per capita). O indicador de longevidade sintetiza as condições de saúde e salubridade daquele local, uma vez que quanto mais mortes houver nas faixas etárias mais precoces, menor será a expectativa de vida observada no local<sup>12</sup>.

Em 2000, os líderes de Estados dos Estados-membros das Nações Unidas (ONU)

firmaram a ***Declaração do Milênio*** e assumiram o compromisso de alcançar os *Objetivos de Desenvolvimento do Milênio* (ODM) até 2015, a saber: (1) Erradicar a extrema pobreza e a fome; (2) Atingir o ensino básico universal; (3) Promover a igualdade entre os sexos e a autonomia das mulheres; (4) Reduzir a mortalidade na infância; (5) melhorar a saúde materna; (6) Combater o HIV/AIDS, a Malária e outras doenças; (7) Garantir a sustentabilidade ambiental; e (8) Estabelecer uma Parceria mundial para o Desenvolvimento<sup>13</sup>.

No tocante à redução nas taxas de mortalidade infantil no atual cenário mundial, as projeções para os ODM ligados à saúde são as piores no grupo de metas estabelecidas até 2015. A projeção para redução da mortalidade infantil infelizmente está neste caso. O número de mortes de crianças com menos de cinco anos diminuiu de 12,4 milhões para 8,1 milhões entre 1990 a 2009, o que implica em quase 12 mil mortes de crianças a menos a cada dia<sup>13</sup>. Progresso notável, mas insuficiente para que o objetivo seja alcançado com redução dessas mortes em dois terços, meta da ONU.

A previsão da ONU aponta para 1,2 milhão de mortes de crianças para o período de 2009 a 2015. O Brasil reduziu a mortalidade infantil (crianças com menos de um ano) de 47,1 para 19 óbitos por mil nascimentos entre 1990 a 2008. Até 2015, a meta é reduzir esse número para 17,9 óbitos por mil nascidos vivos<sup>13</sup>. A expectativa é de que esse objetivo seja cumprido ainda antes do prazo, mas a desigualdade ainda é grande: crianças pobres têm mais do que o dobro de chance de morrer do que as ricas, e as nascidas de mães negras e indígenas têm maior taxa de mortalidade<sup>14</sup>.

No Estado do Rio de Janeiro no período de 1994 a 2007, houve queda na taxa de mortalidade de 30,4 óbitos para 14,8 por mil nascidos vivos. Apesar dessa queda sistemática da mortalidade no Estado, o número de óbitos ainda é alto, comparado com países desenvolvidos, onde a taxa situa-se em torno de 6 óbitos por mil nascimentos<sup>15</sup>.

O processo de transição da mortalidade infantil desencadeou o debate sobre o papel da melhoria das práticas sanitárias e inovações tecnológicas e da melhoria das condições sócio-econômicas sobre a redução da mortalidade. É possível apontar que, nos países onde a queda da mortalidade ocorreu antes das principais descobertas médicas de prevenção e cura das doenças infecto-contagiosas, os fatores de crescimento sócio-econômicos são os principais determinantes em tal redução<sup>16</sup>.

É inquestionável que os fatores exógenos tiveram algum papel nessa redução, mas era inevitável que este modelo de redução da mortalidade por intermédio de medidas sanitárias e de simples medidas de saúde pública tivesse seus limites. Isso pode ter ocorrido em função das grandes mudanças presenciadas nas sociedades latino-americanas em geral, e na brasileira, em particular. A retomada deste declínio dependia, cada vez mais, da associação entre as medidas de redução de morte e a capacidade dos países de realizar mudanças necessárias à incorporação de segmentos na nova economia de mercado urbano-industrial<sup>8</sup>.

A elevação do padrão de vida da população e a implementação de políticas compensatórias nas áreas dos serviços públicos, como, por exemplo, educação, saúde e saneamento básico, também jogam papel importante no declínio da mortalidade. Tal transição da mortalidade infantil foi responsável pela substituição das principais causas de óbitos relacionadas às doenças infecto-contagiosas, que sofreram um declínio pela crescente importância das causas perinatais, decorrentes de problemas durante a gravidez, partos e puerpério. Estas correspondem a mais de 50 % das causas de óbitos no primeiro ano de vida<sup>5</sup>.

Nesse sentido, o movimento pela humanização da atenção perinatal no país, vem contribuindo para o resgate da participação ativa da mulher e da família no processo do nascimento e ainda a abordagem multidisciplinar com a participação e o cuidado no período neonatal visando o alcance de melhores resultados.

Embora a mortalidade e a morbidade neonatal sejam resultantes de uma estreita e complexa relação entre as variáveis biológicas, é importante ressaltar que elementos sócio-econômicos e culturais, bem como fatores assistenciais à saúde, devem fazer parte de estratégias de ação rumo à redução das elevadas taxas de morbi-mortalidade neonatal dos países em desenvolvimento.

Esta proposta indica que, apesar dos avanços demonstrados na saúde materna e cobertura dos serviços de saúde, ainda persistem importantes desafios para a redução da mortalidade neonatal no contexto atual do nosso país. A assistência em saúde reprodutiva e no pré-natal e ainda as práticas clínicas no parto e no nascimento são fatores relevantes para o risco de prematuridade e conseqüentemente para a mortalidade a ela associada. Neste sentido, tanto a melhoria de qualidade do cuidado pós-natal, quanto a maior regulação da assistência hospitalar nos setores público e privado de saúde, podem ser as ações com maior potencial de redução da mortalidade neonatal em mais curto prazo.

Por outro lado, o número de mortes neonatais preveníveis decorrentes de infecções e asfixia, causas persistentes de mortalidade infantil e neonatal no país, mas tradicionalmente de pouca visibilidade dentro do grupo das afecções perinatais, chama a atenção para a complexidade do quadro epidemiológico e aponta para a necessidade de melhorar a qualidade do cuidado já disponível.

Estima-se que mais de 40% das crianças nascidas antes de 33 semanas de gestação são readmitidas no hospital durante o primeiro ano de vida, com predominância de infecções respiratórias<sup>17</sup>.

Adicionalmente, a taxa de mortalidade por doença infecciosa em crianças prematuras, associada a elevadas taxas de re-internação hospitalar no final da infância, sugere a existência de deficiências imunológicas e fisiológicas relacionadas à prematuridade<sup>6</sup>.

Por outro lado, há uma crescente aceitação de que as complicações comuns da prematuridade, como doença pulmonar crônica e paralisia cerebral, não são exclusivamente decorrentes da prematuridade por si só, sendo o desencadeador infeccioso na inflamação perinatal cada vez mais reconhecido como responsável na patogênese dessas sequelas<sup>18-19</sup>.

A imersão no conhecimento da fisiopatologia, etiologia e fatores de risco associados à sepse neonatal, inserida na realidade de nosso sistema de saúde, busca a necessidade da detecção precoce do estado infeccioso, com a tentativa da adoção de medidas específicas e prevenção de sequelas incapacitantes.

Partindo-se da análise da mortalidade neonatal, das morbidades pós-natais e de fatores de risco para infecção, é essencial identificar possíveis impactos de mudanças sociais e econômicas e dos avanços na cobertura e da qualidade dos serviços de assistência pré-natal e nosocomial. É de suma importância identificar os fatores constitucionais e individuais que favorecem ao desenvolvimento de infecção perinatal no paciente vulnerável.

No panorama científico atual, a respeito da variabilidade genética do recém-nascido na competência imunológica frente ao insulto infeccioso, existem poucas publicações sobre o assunto e as evidências publicadas ainda estão sujeitas a controvérsias.

A literatura internacional recente sobre esses fatores constitucionais tem sido predominantemente dirigida ao estudo da produção de citocinas, incluindo a influência de polimorfismos gênicos capazes de influenciar a produção dessa classe de mediadores inflamatórios. Tais estudos são altamente especializados, exigindo métodos que não estão rotineiramente disponíveis em laboratórios clínicos, assim como uma equipe capacitada cientificamente para analisar os resultados e avaliar sua relevância para o prognóstico do paciente individual.

Esses e outros aspectos implicam em custos elevados para a geração, manutenção e operação de uma estrutura laboratorial adequada, e torna-se, portanto, uma questão importante em saúde pública definir até que ponto: a) a literatura internacional já estabeleceu a importância dos estudos de citocinas e dos polimorfismos gênicos associados para o prognóstico de sepse e suas sequelas em neonatos; b) a nossa realidade institucional é adequada para a condução dessas análises, e em que estágio já se encontra a caracterização dos pacientes desta faixa etária em nossa instituição.

A proposta do presente estudo é examinar em conjunto esses dois aspectos, verificando se há evidência de associação de polimorfismos gênicos afetando citocinas inflamatórias e o risco de sepse neonatal em pacientes atendidos na nossa instituição, e contextualizando nossos achados através da avaliação de artigos científicos disponíveis na literatura científica atual.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### 3.1 As Infecções Neonatais

A sepse neonatal é uma das principais causas de morte dos recém-nascidos em todo mundo e configura-se como um dos fatores que mais contribuem para a elevação do índice de mortalidade neonatal<sup>20-21</sup>.

De acordo com o Consenso Internacional de Sepse Pediátrica, sepse é definida como uma síndrome clínica caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica na presença de uma infecção suspeita ou confirmada, ou resultante desta<sup>21-23</sup>.

A sepse é classificada como tardia quando a infecção é confirmada por uma ou mais hemoculturas positivas após 72 horas de vida, na presença de sinais e sintomas clínicos característicos<sup>21-24</sup>.

As infecções no período neonatal têm características que não são observadas em nenhum outro grupo de pacientes em diferentes períodos da vida. Pode-se considerar o recém-nascido (RN), a princípio, como bacteriologicamente estéril, pois adquirirá a flora bacteriana normal nas primeiras horas e nos dias iniciais de vida.

As bactérias que causam sepse neonatal precoce são adquiridas pouco antes, durante e após o parto. Elas podem ser adquiridas diretamente do sangue da mãe, da pele ou do trato vaginal, antes ou durante o nascimento, ou no ambiente durante ou após o parto.

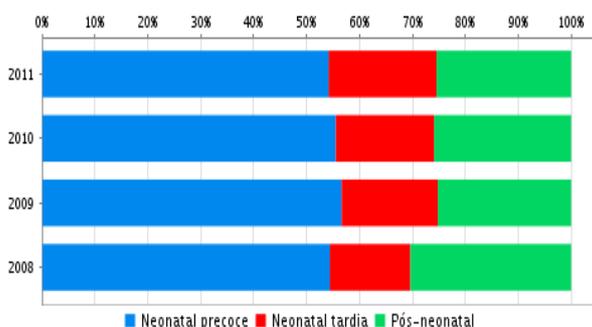
As infecções se correlacionam com algumas deficiências do sistema imunológico e com a fragilidade das barreiras cutâneas e mucosas do neonato. Estas defesas são, ainda, mais frágeis no neonato prematuro e de baixo peso, o qual, além disso, é exposto durante uma internação hospitalar a uma variedade de patógenos maternos e hospitalares. O status imunológico deficitário desse perfil de pacientes<sup>25</sup> associado à inerente

invasividade de uma UTI neonatal, favorece à disseminação de microrganismos hospitalares, a colonização, principalmente do prematuro, por uma flora patogênica, aumentando os riscos para infecção hospitalar e óbito neonatal<sup>25</sup>.

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) afetam mais de 30 % dos neonatos, e quando comparados à população pediátrica de maior idade, seus índices podem ser até cinco vezes maiores<sup>25</sup>.

Estima-se que no Brasil, cerca de 70% dos óbitos no primeiro ano de vida, ocorram no período neonatal, sendo cerca de 55% dentro do período neonatal precoce, ou seja até o sétimo dia de vida, sendo a sepse neonatal uma das principais causas<sup>5</sup>.

**Gráfico 1- N° de óbitos infantis segundo grupo etário no ano de 2011**



Número de óbitos infantis (masculinos e femininos) investigados, no ano selecionado e últimos quatro anos precedentes, segundo grupo etário. Fonte: Módulo SIM - Janeiro de 2012

Ressaltamos que aproximadamente 55% dos óbitos evitáveis ocorrem por inadequada atenção ao recém nascido, como mostra o gráfico a seguir, com dados do sistema de informação sobre mortalidade no Brasil.

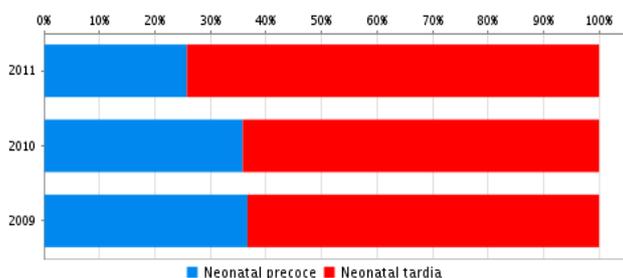
## Gráfico 2 - Nº de óbitos neonatais precoces evitáveis, em função da forma de prevenção em 2011

Fonte: Módulo SIM - Janeiro de 2012



De fato, como se observa no gráfico abaixo, o número de óbitos em 2009 redutíveis por Ações de Promoção à Saúde na faixa etária neonatal precoce foi de 35%. No ano de 2011, esse mesmo percentual declinou para 25%. Podemos imaginar que tal redução se deu por melhorias realizadas no âmbito das Ações de Atenção à Saúde e identificação imediata de possíveis óbitos no período neonatal precoce.

## Gráfico 3 - Nº de óbitos redutíveis por ações de Promoção à Saúde nas Ações de Atenção na faixa etária neonatal no ano de 2011



Número de óbitos neonatais (masculinos e femininos) investigados, no ano selecionado e últimos quatro anos precedentes, segundo grupo etário. Fonte: Módulo SIM - Janeiro de 2012

### 3.1.1 Epidemiologia das infecções neonatais

Segundo The World Health Organization (WHO), estima-se que 1 milhão de mortes por ano (ou seja, 10 % de toda a mortalidade abaixo dos cinco anos) é

consequência de sepse neonatal. Destas mortes, 42% ocorrem na primeira semana de vida<sup>28</sup>.

Alguns estudos regionais no país mostraram índice médio de infecções relacionadas à saúde de 25/1000 RN-dia<sup>27</sup>.

Sabe-se que a incidência de IRAS em neonatos está relacionada com o peso ao nascimento e com a utilização de cateter venoso central (CVC). A infecção primária da corrente sanguínea (IPCS) associada à presença do CVC é a principal infecção em UTI neonatal, embora existam serviços com outras realidades em nosso país.

Segundo Pessoa da Silva e colaboradores, em seu estudo no país, a densidade de incidência de IPCS variou de 17,3 IPCS/1000 CVC-dia em RN entre 1501g a 2500g até 34,9 IPCS/1000 CVC-dia em RN<1000g<sup>27</sup>.

A contaminação pelo *Streptococcus agalactiae* (Estreptococo do grupo B, o GBS) é a causa mais comum de sepse neonatal em muitos países, embora as taxas baixas sejam relatadas em muitos países de baixa renda, especialmente, os do sul da Ásia. Os bacilos Gram negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*) e cocos Gram positivos (como o *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) são outras causas importantes<sup>23,29-30</sup>.

A incidência da sepse neonatal tardia ou nosocomial é 100 vezes maior que a da sepse precoce, em decorrência da maior sobrevivência de RNs de muito baixo peso, uma vez que esses necessitam de maior tempo de hospitalização, possuem barreiras físicas menos eficientes contra infecção e apresentam maior imaturidade do sistema imunológico<sup>23-32</sup>.

O uso prolongado de cateteres profundos, de nutrição parenteral total, a ventilação mecânica, uso de antibioticoterapia prévio, de uso de bloqueadores de receptores H2 e a demora no início da dieta enteral também contribuem efetivamente para esse alto índice de infecção nosocomial<sup>33-35</sup>.

Em relação à microbiologia, os germes mais comumente identificados incluem *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase* negativo, *Enterococcus sp.* e Enterobactérias e, num estágio mais tardio, a *Candida sp.*<sup>32</sup>.

O principal germe relacionado à sepse tardia é o *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN), responsável por 40% dos casos<sup>3</sup>.

Existe uma dificuldade em determinar a incidência precisa dessa sepse devido à dúvida na diferenciação entre hemoculturas positivas por contaminação da amostra e por uma infecção verdadeira. Germes que colonizam a pele e contaminam a superfície externa dos cateteres podem gerar uma infecção de disseminação hematogênica<sup>3</sup>. As infecções sistêmicas por microorganismos Gram- causam 20 a 30 % das infecções tardias, com uma taxa de mortalidade ao redor de 30 a 50%<sup>22</sup>.

Agentes virais também podem estar relacionados às infecções nosocomiais, geralmente em paralelo com surtos comunitários.

A taxa de mortalidade total relacionada à sepse tardia é de 17 %, sendo maior quando causada por germes Gram- (36%) e fungos (32%), e menor quando causada pelo *Staphylococcus* Coagulase negativa<sup>3</sup>.

Antes da era dos antibióticos, a sepse neonatal era frequentemente fatal. Atualmente, dados mostram que as taxas de letalidade em crianças tratadas com antibióticos podem variar entre 5% e 60%, com proporções mais altas nos países de menor renda<sup>36</sup>.

O uso antenatal de corticosteróides pode reduzir em 47% a incidência de síndrome do desconforto respiratório, em 40% a mortalidade entre as crianças nascidas pré-termo, e em 52% a ocorrência de hemorragia intracraniana<sup>37</sup>. Porém, cursos com altas doses de corticóide antenatal, ou repetidos semanalmente, podem refletir em um crescimento intrauterino restrito e, a longo prazo, podem ocasionar atraso no neurodesenvolvimento, não sendo portanto recomendados<sup>38</sup>.

### 3.1.2 Fatores de Risco para Sepses Neonatal

Os fatores de risco neonatais estão diretamente relacionados aos antecedentes gestacionais e periparto. A prematuridade é, sem dúvida, o fator de risco mais importante pela incidência de sepses neonatal precoce. Está frequentemente associada à pré-eclâmpsia, baixo peso ao nascer, asfixia perinatal e infecções estreptocócicas maternas<sup>40</sup>.

**Tabela 1 - Fatores de Risco para o Desenvolvimento de Sepses Neonatal**

<b>FATORES DE RISCO PARA DESENVOLVIMENTO DE SEPSIS NEONATAL</b>	
<b>FATORES MATERNOS</b>	<b>SALA DE PARTO</b>
Idade materna (> 30 anos) Ausência de Pré-natal Multiparidade Rotura Prematura e prolongada das membranas ovulares (>6h) Líquido meconial tinto de mecônio Aspiração de líquido amniótico Parto Prematuro Corioamnionite Colonização retovaginal por GBS ITU Materna Múltiplos cursos de corticoide ou agentes tocolíticos Parto prolongado	Prematuridade Baixo peso ao nascer $\leq 2500g$ Apgar no 5º minuto < 5 Ressuscitação na sala de parto Sexo masculino
<b>NEONATAL</b>	
Cateter vascular Ventilação mecânica (CPAP ou IOT) Ausência de alimentação enteral Patologias do trato gastrointestinal Medicamentos ( bloqueadores H2, inibidores da bomba de prótons, corticóides pós-natal, cefalosporinas) Neutropenia Baixas concentrações de Imunoglobulina G Hiperalimentação Internação hospitalar prolongada Atraso na recuperação do peso de nascimento	

O risco de infecção neonatal aumenta em seis vezes quando há associação de colonização materna com a ruptura de membranas ovulares por tempo maior que 18 horas; quatro vezes quando há associação da colonização com a febre materna; e sete vezes quando há associação da colonização materna com a prematuridade<sup>41</sup>.

A profilaxia antibiótica intra-parto contra *S. agalactiae* também levou a uma mudança substancial no perfil de patógenos causadores de sepse neonatal precoce; bacilos Gram- e *Staphylococcus spp*, predominam nos países que puseram em execução esses programas<sup>42</sup>.

Os fatores de risco distais para sepse neonatal incluem a pobreza e condições ambientais desfavoráveis. Já os fatores de risco adjacentes incluem ruptura prolongada de membranas, prematuridade, febre materna, parto sem higiene e sem cuidado pós-natal, baixo peso ao nascer e alimentação pré-láctea de alimentos e líquidos contaminados<sup>25-26,43</sup>.

Os fatores de risco frequentemente associados à sepse tardia incluem a prematuridade (devido à imaturidade do sistema imunológico), procedimentos invasivos terapêuticos, ventilação mecânica, nutrição parenteral, antibiótico de amplo espectro, cirurgia, longa permanência hospitalar e não-seguimento das normas de prevenção de infecção hospitalar<sup>20-22</sup>.

### 3.1.3 Diagnóstico de Sepse Neonatal

As infecções no período neonatal possuem características que não são observadas em nenhum outro grupo de pacientes em diferentes períodos da vida, e a susceptibilidade aumentada às infecções no neonato se correlaciona com algumas deficiências do sistema imunológico e com fragilidade das barreiras cutâneas e mucosas típicas desta faixa

etária. Tais defesas são ainda mais frágeis no recém nascido prematuro e de baixo peso ao nascer.

O diagnóstico de sepse neonatal precoce é difícil, e os sinais clínicos podem ser mínimos ou inespecíficos. Detectar um quadro infeccioso é o objetivo primordial quando um pediatra se depara com neonatos que apresentam sinais e sintomas inespecíficos e, que possuem ou não, fatores de risco maternos para sepse neonatal.

Em recém-nascidos, os sinais e sintomas, bem como os marcadores laboratoriais de sepse, são inespecíficos; sendo necessário para o neonatologista usar uma combinação de variáveis para aumentar o valor preditivo do diagnóstico precoce<sup>21-22</sup>.

O diagnóstico de infecção em prematuros pode ser mais difícil ainda. A apresentação clínica é sutil e não-específica, podendo apresentar sinais como: icterícia, temperatura corporal instável, dificuldade respiratória, alterações do ritmo cardíaco, e dificuldade na alimentação<sup>33,44</sup>.

As variáveis clínicas utilizadas para definir SIRS e disfunção orgânica são muito afetadas pelas mudanças fisiológicas que ocorrem em determinadas faixas etárias pediátricas.

Goldstein e colaboradores propuseram uma classificação estratificada em seis grupos de idades específicas, de acordo com sinais vitais e variáveis laboratoriais<sup>22</sup>. Vários sinais e sintomas são usados como critérios sugestivos de sepse, dentre eles: a instabilidade térmica; as alterações de frequência cardíaca e respiratória associadas à gemência e tiragens; a letargia; a intolerância alimentar; as alterações de perfusão tissular e também as variáveis laboratoriais, tais como leucocitose ou leucopenia; trombocitopenia; elevação da proteína C reativa e alterações de interleucinas<sup>21-22</sup>.

A utilização de uma associação de exames laboratoriais tem apresentado alta sensibilidade e boa acurácia em diversos estudos publicados nas duas últimas décadas. Entre os testes diagnósticos destacam-se: hemocultura, exame de líquido, urinocultura,

leucograma, contagem de plaquetas, VHS (Velocidade de Hemossedimentação) e testes imunológicos incluindo a dosagem de reagentes da fase aguda produzidos em resposta a diversos estímulos inflamatórios (Proteína C reativa, e algumas citocinas)<sup>40</sup>.

Indicadores confiáveis de sepse seriam úteis para um diagnóstico preciso, resultando em uma diminuição do uso desnecessário de antibióticos<sup>45</sup>. A sensibilidade de cada teste laboratorial está longe de 100% e as medições do antagonista dos receptores de IL-1 (IL-1Ra), da IL-6, da IL-8, ainda são em muitos países confinadas a laboratórios de investigação<sup>46-48</sup>.

Embora a diferenciação entre colonização e infecção possa ser difícil quando se obtêm culturas de aspirado endotraqueal em neonatos cronicamente ventilados, as amostras de aspirado endotraqueal são úteis quando coletadas nas primeiras 12 horas de vida. Sherman e colaboradores demonstraram uma positividade de 44% no aspirado traqueal de RNs com pneumonia e hemocultura com ausência de germes<sup>49</sup>.

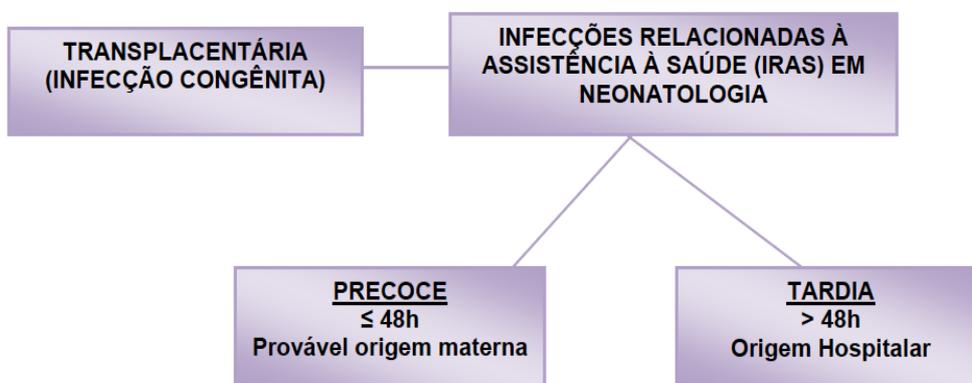
Os exames laboratoriais coadjuvantes para o diagnóstico de sepse neonatal não são específicos, porque avaliam a resposta inflamatória promovida pelo agente causador, não identificando o agente etiológico. Já a utilização de uma associação de exames laboratoriais tem apresentado alta sensibilidade e boa acurácia em diversos estudos publicados nas duas últimas décadas. Entre os testes diagnósticos destacam-se: hemocultura, exame de líquido, urinocultura, teste hematológico (leucograma, plaquetas, VHS)<sup>50</sup>.

As hemoculturas, apesar de serem o padrão-ouro para o diagnóstico, possuem baixa sensibilidade e podem não estar disponíveis no momento de definição da terapêutica inicial. Dada a rápida progressão e a alta mortalidade da sepse em prematuros, o uso de agentes antimicrobianos de largo espectro é frequentemente iniciado na primeira suspeita clínica de infecção, apesar do maior risco de toxicidade pela droga, devido à imaturidade do sistema hepático e renal<sup>51</sup>.

Vários estudos vêm sendo realizados na tentativa de estabelecer qual teste ou combinação de testes pode diagnosticar precoce e corretamente os quadros de sepse, e que marcadores seriam considerados indispensáveis para dar início à antibioticoterapia naqueles neonatos com fatores de risco maternos, mas sem sinais clínicos de infecção.

Diante desse cenário, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) elaborou em 2008 o documento *Critérios Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde* (2ª. versão 2010) com a finalidade de sistematizar a vigilância das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) em neonatologia e objetivando a prevenção dos agravos à saúde neonatal<sup>27</sup>. Neste documento contemplam-se as infecções relacionadas à assistência, tanto do ponto de vista da prevenção, como do diagnóstico e do tratamento.

**Figura 1- Diagnóstico de Sepse Neonatal e sua origem**



#### **A- Transplacentárias**

São infecções adquiridas por via transplacentária, acometimento intra útero.

## **B- Infecções Relacionadas à Saúde (IRAS) Precoce de Provável Origem Materna**

Infecção cuja evidência diagnóstica (clínica/laboratorial/microbiológica) ocorreu nas primeiras 48 horas de vida com fator de risco materno para infecção.

Definem-se como fatores de risco materno:

- Bolsa rota maior que 18 hora (h);
- Cerclagem;
- Trabalho de parto em gestação menor do que 35 semanas;
- Procedimento de medicina fetal nas últimas 72 horas;
- Infecção do trato urinário (ITU) materna sem tratamento ou em tratamento há menos de 72 horas;
- Febre maternal nas últimas 48 horas;
- Coriarnionite;
- Colonização pelo Estreptococo B em gestante, sem quimioprofilaxia intra-parto, quando indicada. Segundo orientações do guideline *Recomendações para Prevenção da Infecção Perinatal pelo Streptococcus do Grupo B (GBS)* do CDC<sup>52</sup>.

**C- Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) tardia de origem hospitalar:** ocorre após as primeiras 48 h de vida, sendo por sua vez dividida em :

**1. Infecção primária da corrente sanguínea (IPCSL) com confirmação microbiológica.**

Deverá apresentar um dos seguintes critérios:

- 1) Uma ou mais hemoculturas não contendo contaminantes da pele, em que o microorganismo não esteja relacionado à infecção em outro sítio;
- 2) Pelo menos 1 dos seguintes sinais e sintomas\* abaixo, sem outra causa não infecciosa reconhecida:

**Tabela 2 - Sinais clínicos e Sintomas para o Diagnóstico de Sepses Neonatal**

Instabilidade térmica	Piora do desconforto respiratório
Bradycardia	Intolerância à glicose
Apnéia	Instabilidade hemodinâmica
Intolerância alimentar	Hipoatividade / Letargia

E pelo menos um dos seguintes:

- Microorganismos contaminantes comuns de pele, cultivados em pelo menos duas hemoculturas, em dois locais diferentes, com intervalo máximo de 48h entre as coletas;
- *Staphylococcus* coagulase negativa cultivado em pelo menos 1 (uma) hemocultura periférica de paciente com CVC. Nesse caso, deve-se valorizar a evolução clínica e exames complementares e o tempo de crescimento de microorganismo após incubação.

Se a amostra positiva for colhida somente de CVC, não valorizar como agente etiológico da infecção, recomendando-se coleta preferencialmente de duas amostras de hemoculturas com anti sepsia e volume de, pelo menos, **1 ml** por amostra.

Deve-se colher hemocultura antes do início da antibioticoterapia ou, se esta já foi iniciada, colher no vale da droga (antes da próxima dose).

### **B. Infecção primária da corrente sanguínea clínica sem confirmação microbiológica (IPCSC) ou sepses clínica**

Deverá apresentar **pelo menos um** dos seguintes sinais e sintomas\* sem outra causa reconhecida, além de todos os seguintes critérios:

- Hemograma com  $\geq 3$  parâmetros alterados (escore de Rodwell, detalhado na Tabela) e/ou Proteína C reativa quantitativa alterada ;

**Tabela 3 - Escore Hematológico de Rodwell**<sup>53</sup>

- 1- leucopenia ou leucocitose
- 2- neutropenia ou neutrofilia
- 3- aumento de neutrófilos imaturos
- 4- aumento de neutrófilos imaturos/neutrófilos totais
- 5- neutrófilos imaturos/neutrófilos segmentados > 0,3.
- 6- neutrófilos com granulação tóxica ou vacuolização
- 7- plaquetopenia.

1 (um) ponto para cada um desses parâmetros e valor máximo de 7 (sete)

- Hemocultura não realizada ou negativa;
- Ausência de evidência de infecção em outro sítio;
- Terapia antimicrobiana instituída e mantida pelo médico assistente.

Na suspeita de sepse precoce, recomenda-se colher hemocultura (s) antes do início da antibioticoterapia empírica, preferencialmente entre 12 e 24 horas de vida.

Um estudo clínico retrospectivo realizado por Kingsmore e colaboradores (2008), com o intuito de identificar biomarcadores séricos para o diagnóstico de infecção em prematuros, utilizou a técnica de microarranjos (*microarray*) para avaliar o nível de 142 proteínas séricas em 107 pacientes infectados e não infectados. As análises revelaram alterações significativas nos níveis de expressão dos genes correspondentes a 8 proteínas nos neonatos infectados, as quais estão associadas com inflamação, coagulação e fibrinólise, mostrando que o uso de imunoenaios para esses mediadores pode ter uma utilidade clínica como adjuvante para o rápido diagnóstico da infecção<sup>54</sup>.

Outros estudos vem sendo realizados para tentar estabelecer que teste ou combinação de testes possam diagnosticar precoce e corretamente os quadros de sepse neonatal, e especialmente que marcadores seriam considerados indispensáveis para dar início à antibioticoterapia<sup>41,50</sup> naqueles recém-nascidos com fatores de risco maternos, mas sem sinais clínicos de infecção.

Sabe-se que o diagnóstico precoce da sepse neonatal e seu correto tratamento, podem ajudar significativamente no prognóstico da sepse, bem como evitar as possíveis sequelas e o óbito.

### 3.2 Imunidade Neonatal

O sistema imune inato, que funciona principalmente durante as respostas inflamatórias, inclui o sistema de células fagocitárias, isto é polimorfonucleares e fagócitos mononucleares (monócitos e macrófagos) e vários sistemas de amplificação, como os sistemas do complemento, da coagulação e das cininas<sup>55</sup>.

O sistema imune adaptativo consiste nos sistemas celular (células T) e humoral (células B). É importante frisar que os sistemas inato e adaptativo são intimamente interrelacionados e interdependentes. Por exemplo, a ativação do sistema Complemento por imunoglobulinas (IgM e IgG), ou a produção de fatores quimiotáticos e outras citocinas, desempenham um papel significativo em toda a resposta inflamatória. O monócito ou macrófago podem atuar nas respostas inflamatórias e exercer um papel expressivo no processamento de antígenos, etapas que são essenciais à indução de resposta imune específica<sup>55</sup>. As citocinas são outros produtos secretados pelas células que participam dos mecanismos imunes inato e adaptativo.

Várias anormalidades da imunidade podem afetar o recém nascido, incluindo anormalidades quantitativas e qualitativas da função celular e humoral<sup>56-58</sup>. As anormalidades quantitativas da imunidade inata, que também estão presentes, são relacionadas com o tamanho e capacidade de regenerar células maduras para os *pools* de armazenamento de células fagocitárias no fígado fetal e baço, na medula óssea e outros locais neonatais como pulmão e pele. Já as anormalidades qualitativas estão relacionadas

com a aderência e migração dirigida, ou seja, quimiotaxia de células fagocitárias em resposta a um estímulo exógeno (proteínas bacterianas) ou endógeno (produtos celulares ou plasmáticos); a fagocitose (opsonização) e inativação (processamento de antígenos no material fagocitado).

Neonatos possuem um sistema imune imaturo do ponto de vista funcional. Eles têm níveis de imunoglobulina extremamente baixos, com exceção de Ig G materna contra alguns antígenos, transferidos passivamente através da placenta durante o último trimestre da gravidez<sup>59-60</sup>.

A função das células T está relativamente inalterada, mas a atividade do Complemento é metade da encontrada em adultos saudáveis. Neonatos possuem um número pequeno de neutrófilos de reserva, e os neutrófilos circulantes apresentam uma reduzida capacidade migratória do sangue periférico para os sítios de infecção<sup>61</sup>.

A expressão basal de receptores do tipo Toll (TLRs, receptores que detectam a presença de microorganismos) é similar no neonato e no adulto<sup>62</sup>. Entretanto, a resposta imune inata das células mononucleares de neonatos, é caracterizada por uma redução significativa da liberação de citocinas pró-inflamatórias polarizantes para o perfil Th1, como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), com a preservação relativa de citocinas anti-inflamatórias, polarizantes para o perfil Th2, como a interleucina 6 (IL6)<sup>63</sup>.

Os *pools* de armazenamento de polimorfonucleares (PMN) são consideravelmente menores por kg de peso corporal no RN, tanto prematuro como a termo, do que em adultos<sup>64-65</sup>. Os neonatos são menos capazes de aumentar seus números de PMN porque a taxa proliferativa de suas células progenitoras já está próxima do máximo em comparação com os adultos<sup>66</sup>.

Os problemas imunológicos no período neonatal são evidentes na apresentação clínica da sepse neonatal. Os recém-nascidos não possuem uma resposta rápida à infecção

e esta pode ter progressão fulminante. O monitoramento da infecção por resultados laboratoriais, incluindo marcadores hematológicos e imunológicos de infecção e inflamação, é de difícil interpretação nesta faixa etária. Bebês de baixo peso ao nascer (pré-termos e pequenos para a idade gestacional) têm a imunidade ainda mais comprometida, e estão, especialmente, em risco de sepse<sup>67</sup>.

Entretanto, neonatos possuem proteínas e peptídeos antimicrobianos (APPs) de membrana, funcionais e de carga catiônica. Estes APPs podem ser achados no vérnix caseoso que cobre a pele ao nascer, e nos tratos respiratório e gastrointestinal<sup>67</sup>.

Adicionalmente, a taxa de mortalidade por doença infecciosa em crianças prematuras e a taxa de reinternação hospitalar permanecem elevadas, mesmo no final da infância, sugerindo defeitos da imunidade a longo prazo, decorrentes da prematuridade<sup>1</sup>.

Além da suscetibilidade a doenças infecciosas, outros parâmetros relacionados com a função imunológica, como as respostas à vacinação, parecem ser significativamente afetados em crianças prematuras

### **3.3 Polimorfismos Genéticos e Sepse**

Polimorfismo genético é uma variante alélica que existe de forma estável numa população, a qual não pode ser explicada por novas mutações (geralmente com frequência superior a 1%). O mais frequente tipo de polimorfismo é o polimorfismo de um único nucleotídeo, ou também chamado de polimorfismo de base única (SNP), que pode resultar de substituição, deleção, ou inserção de um nucleotídeo<sup>10</sup>. Existem diferentes tipos de polimorfismos: os de base única (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*), onde há troca de uma única base nitrogenada por outra; os de inserção/deleção, nos quais há adição ou ausência de uma ou mais bases; e os SSLP (*Simple Sequence Length Polymorphism*), STR (*Short Tandem Repeats*) e VNTR

(*Variable Number Tandem Repeats*), nos quais há repetições de sequências simples ou repetições curtas em Tandem.

Aproximadamente 1 em cada 300 a 500 bases do DNA humano pode apresentar um SNP, ou seja, diferir da sequência predominante na população para aquela posição. A mutação pode ser na região codificante (éxon) ou na região não codificante do gene (íntron), ou na região promotora. Quando o SNP é dentro de um éxon, o alelo variante pode apresentar uma substituição de aminoácido, que em alguns casos (mas nem sempre) resulta numa proteína funcionalmente alterada.

A estimativa do número total de SNPs em todo o genoma humano é mais de 10 milhões, mas apenas uma pequena porcentagem (2-3%) é conhecida por alterar a função ou a expressão gênica. O estudo de SNPs em genes associados à fisiopatologia e à patogenia de doenças é de grande utilidade, pois variantes desses genes podem conferir susceptibilidade a (ou proteção contra) determinados eventos ou patologias<sup>10-69</sup>.

Alguns pesquisadores têm utilizado a detecção da presença de polimorfismos de base única para avaliar o risco de desenvolver sepse<sup>70-71</sup>.

A variação observada nos estudos pioneiros de Mendel foi devida a uma diferença simples de fenótipo determinada por diferenças genótípicas envolvendo um único gene. Em casos de doenças causadas por mutações em um único gene, que apresentam este padrão de herança dito mendeliano, a análise de ligação compara a herança da doença, definida fenotipicamente, com a herança de marcadores genéticos em famílias com vários membros afetados. Marcadores mais próximos do gene da doença mostram a correlação mais forte com padrões de doenças nas famílias, e o rastreamento de eventos de recombinação pode delimitar a região do gene da doença de entre 100 e vários milhares de pares de bases<sup>72</sup>.

Em contraste, a maioria dos traços fenotípicos já descritos, assim como a suscetibilidade a algumas doenças muito comuns, como a diabetes do tipo II e a

aterosclerose, são determinados por vários genes que foram mapeados em *loci* diferentes, e não pelo efeito de um único gene. Estes são exemplos de herança multifatorial. Altura e inteligência são exemplos de traços poligênicos, exibindo herança "não mendeliana". Exemplos de herança poligênica incluem também a suscetibilidade à sepse e ao choque séptico. A identificação da base genética é muito mais difícil do que no caso de herança mendeliana<sup>10</sup>.

SNPs podem ser usados como marcadores de todo o genoma para análise de ligação em famílias com membros afetados, bem como em estudos de associação em indivíduos de uma população e na avaliação evolutiva de grandes populações humanas<sup>73</sup>. Alternativamente, SNPs associados com o fenótipo de interesse são úteis para identificar genes candidatos com vistas a um estudo mais aprofundado. Um exemplo é o estudo da associação do gene TNF- $\alpha$  com a susceptibilidade ao choque séptico. Monócitos de indivíduos homocigotos para um alelo variante de TNF- $\alpha$  apresentam níveis circulantes mais elevados de TNF- $\alpha$  em resposta à estimulação por endotoxinas<sup>74</sup>, o que pode estar relacionado com a susceptibilidade ao choque séptico, que se supõe ser mediado por esta citocina.

Um estudo de associação em pacientes com trauma, homocigotos para uma variante do TNF- $\alpha$ , identificou um maior risco de sepse grave em relação ao outro genótipo<sup>75</sup>.

Diferenças genéticas entre os indivíduos podem afetar tanto a probabilidade de desenvolverem sepse como de sobreviverem à sepse em determinadas condições adversas<sup>69-70</sup>.

Variações genéticas ou mutações que interferem na capacidade do sistema imune de identificar microorganismos poderiam explicar variações na eficiência da resposta a uma infecção, na diversidade da apresentação clínica da sepse, ou na resposta ao tratamento<sup>68,70</sup>.

Outra aplicação do estudo de SNPs é relacionado com o impacto dos haplótipos, definidos por combinações de polimorfismos genéticos específicos, na suscetibilidade à condição de interesse. Polimorfismos não existem isolados e podem ser uma combinação de trocas de bases em diversos sítios, por exemplo haplótipos, podendo influenciar na função da proteína constituída<sup>77</sup>. Como exemplo, o haplótipo G/A/A no gene para o  $\beta$ -fibrinogênio está associado com baixa mortalidade e menor disfunção de órgãos em pacientes sépticos<sup>10</sup>, tendo portanto um efeito protetor.

Polimorfismos mapeados no Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano (Complexo HLA) estão associados com a susceptibilidade à infecção. Esses polimorfismos estão presentes em genes que influenciam a resposta inflamatória, e são fortes candidatos a determinantes genéticos da predisposição à sepse e ao choque séptico<sup>77</sup>.

A inflamação e a coagulação estão intimamente relacionadas com as moléculas codificadas por esses genes, como as citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e LT- $\alpha$  (também chamado TNF- $\beta$ ) tornando assim importante o estudo dos polimorfismos genéticos com correlações fisiopatológicas, as quais podem ser a chave para o entendimento da predisposição individual à sepse<sup>77</sup>.

Alguns genes podem influenciar a intensidade da resposta inflamatória sistêmica à infecção, e predispor à síndrome da resposta inflamatória sistêmica. A maioria desses estão localizados na região fortemente polimórfica do cromossomo 6 que inclui o Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano.

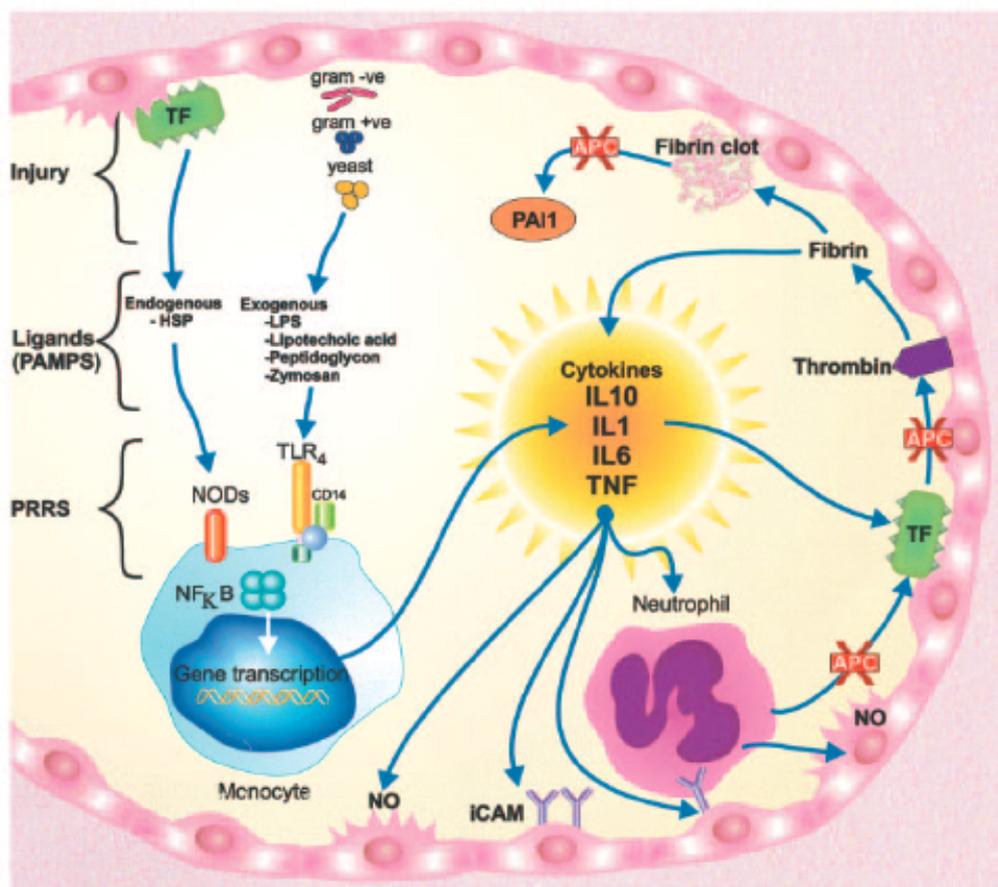
O gene candidato ideal para a correlação fisiopatológica, deve ter plausibilidade biológica, e a variante mais comum deve ser fenotipicamente normal. No caso da sepse, no entanto, esta especificação é enganosa, porque a causa da sepse não é o polimorfismo em si, e sim a infecção. Desta forma, a exposição infecciosa é indispensável à definição dos padrões de resposta tanto normais como patológicos, associados respectivamente às

variantes majoritária e minoritária do gene candidato de interesse.

Um diagrama simplificado da resposta imune inata à infecção e da injúria tecidual envolvendo citocinas inflamatórias e a cascata de coagulação ajuda a visualizar quais citocinas inflamatórias estão envolvidas, e mostra que a cascata de coagulação é um dos primeiros eventos, estando intimamente relacionada com o processo inflamatório e com a resposta imune inata (Figura 1).

O fator tecidual (TF) pode ser produzido pela lesão celular direta, e ativado pela adesão de neutrófilos, ativa a cascata de coagulação, resultando na produção de trombina e deposição de fibrina, a qual é também regulada por mediadores da inflamação, incluindo citocinas inflamatórias<sup>73</sup>. Além disso, citocinas inflamatórias estimulam a liberação de TF a partir de monócitos e endotélio. Moléculas contra reguladoras, tais como APC (célula apresentadora de antígeno) inibem este processo em vários níveis. Para exemplo, a APC inibe a produção de trombina, e inibe a marginação de monócitos e neutrófilos em endotélio lesado, inibindo assim um aumento na produção de citocinas inflamatórias. A APC também aumenta a resposta fibrinolítica através da regulação negativa de PAI-1 (Inibidor do Ativador de Plasminogênio do tipo 1).

Figura 2- Diagrama da resposta imune inata à infecção e a injúria tecidual envolvendo citocinas inflamatórias e a cascata de coagulação



Fonte: Reproduzido de Holmes et al. *Genetic Polymorphisms in Sepsis and Septic Shock*. Critical Care Review. CHEST 2003; 124: 1103-1115

Nas seções que se seguem, serão apresentados os mediadores da resposta inflamatória e os polimorfismos genéticos já identificados por alguns estudos como tendo alguma influência na gravidade da resposta inflamatória sistêmica.

### 3.3.1 Fator de Necrose Tumoral e *TNF-308*

O Fator de Necrose Tumoral (TNF ou TNF- $\alpha$ ) é um potente mediador da resposta inflamatória em resposta a patógenos e toxinas, secretado principalmente por macrófagos

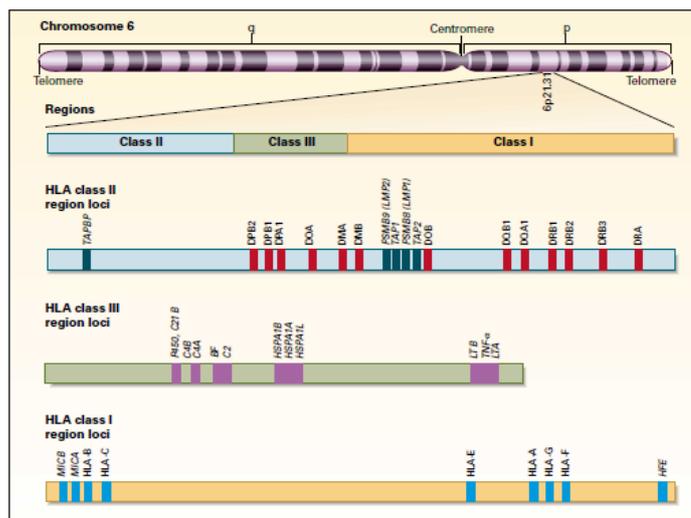
e neutrófilos após exposição a esses agentes. É um dos principais mediadores da resposta inata, crucial para a indução da resposta local protetora contra infecções, trauma ou isquemia<sup>78</sup>. O TNF já é secretado alguns minutos após a infecção, porém após 3-4h a sua produção pára e os níveis séricos passam a ser quase indetectáveis<sup>73-80</sup>.

O TNF vem sendo descrito como um dos principais mediadores do choque séptico, uma vez que é encontrado em pacientes com esta condição e em modelos experimentais de choque, além de ser capaz de disparar todo o espectro de consequências hemodinâmicas, metabólicas e patológicas relacionadas, como extravasamento capilar, hipotensão, SDRA e DMOS<sup>78</sup>. Também é considerado um dos mais importantes mediadores dos efeitos induzidos por endotoxina, sendo descritas diferenças interindividuais na sua liberação<sup>81</sup> e tendo alguns estudos mostrado relação entre níveis elevados e a gravidade da sepse<sup>77</sup>.

Além de induzir a expressão das moléculas de adesão no endotélio vascular dentro das áreas infectadas, TNF- $\alpha$  induz as células endoteliais a produzir moléculas como o fator ativador de plaquetas (PAF), desencadeando a coagulação sanguínea e promovendo obstrução do fluxo sanguíneo. A coagulação desempenha um papel em reduzir a disseminação de patógenos pela circulação, mas nos casos em que tal processo local ocorra de modo exacerbado, as consequências podem tornar-se catastróficas<sup>82</sup>.

O *locus* gênico do TNF- $\alpha$  está posicionado próximo ao do TNF- $\beta$  (LT- $\alpha$ ), dentro do complexo HLA, no braço curto do cromossomo 6, na região de Classe III e já foi bem caracterizado<sup>81</sup> (Figura 2). O SNP na posição -308 deste *locus* parece ter significância funcional por afetar a transcrição do gene para TNF- $\alpha$ . Tal polimorfismo presente na região promotora consiste de um **G** (TNF-308) no alelo mais frequente e um **A** (TNF-308) no alelo minoritário, o que pode modificar sua expressão gênica<sup>76</sup>.

Figura 3 – O Sistema HLA



Fonte: Reproduzido de Klein J e Sato A. The HLA system. N Eng J Med 2000; 343 (10): 702-709.

Como o TNF é um dos principais mediadores na fisiopatologia da sepse, indivíduos geneticamente predispostos a fazer produção intensa da citocina em resposta aos estímulos adequados (altamente responsivos, *high responders*), o que não é necessariamente atribuível a um SNP específico, podem ser considerados de maior risco para o desenvolvimento de DMOS e óbito, quando expostos a infecções mais graves, trauma e outras injúrias que possam evocar resposta inflamatória sistêmica<sup>71</sup>.

Vários polimorfismos de base única têm sido identificados na região promotora do gene do TNF, apresentando impacto variável na produção espontânea ou estimulada de TNF, tanto *in vivo*, quanto *ex vivo*. Dentre estes, um polimorfismo de base única que diretamente afeta a expressão do TNF foi localizado na região promotora do gene *TNF*, na posição -308 (rs 1800629)<sup>76</sup>, ou seja, 308 nucleotídeos acima do sítio de início da transcrição do gene. Este polimorfismo resulta em duas formas alélicas, uma onde a Guanina (G) define o alelo selvagem *TNF* 1 e outro onde a Adenina (A) define o alelo variante *TNF* 2 (polimorfismo -308) de acordo com a frequência populacional. Assim, um indivíduo pode ser homocigoto para o alelo mais comum (*TNF*-308 GG) ou ser

carreador do alelo raro A, sejam eles homozigotos (*TNF*-308 AA) ou heterozigotos (*TNF*-308 GA).

O alelo *TNF* A foi associado com a gravidade da apresentação clínica e mortalidade em uma variedade de doenças infecciosas. Esta associação foi descrita em Doença de Kawasaki em crianças<sup>82</sup>, nas formas graves de malária cerebral<sup>81</sup>, na demência relacionada ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) em adultos<sup>80</sup>, em crianças com infecção meningocócica<sup>81</sup>, em adultos com pneumonia comunitária<sup>83</sup> e na leishmaniose mucocutânea<sup>84</sup>.

Este polimorfismo foi amplamente estudado na sepse, já que o gene polimórfico poderia resultar em liberação alterada de TNF após exposição aos patógenos. De fato, homozigotos para o alelo A na posição *TNF*-308 produzem maiores quantidades de TNF durante o choque séptico e têm um risco de mortalidade significativamente maior, quando comparados a pacientes que são homozigotos ou heterozigotos para o alelo G<sup>10</sup>. Estudos de associação entre o alelo *TNF*-308 A e sepse foram realizados em pacientes com sepse primária, causada por diferentes agentes, e com sepse secundária, após trauma, queimaduras ou realização de cirurgias eletivas. A presença do SNP foi correlacionada à susceptibilidade a sepse, aos diferentes espectros clínicos da sepse e à mortalidade.

Em crianças, muitos dos estudos publicados são em neonatologia. Hedberg e colaboradores publicaram um estudo com 173 prematuros de muito baixo peso, sem encontrar associação do SNP *TNF*-308 com susceptibilidade a sepse, porém observou-se uma mortalidade três vezes maior em carreadores A. No entanto, não encontrou-se a mesma associação em 67 prematuros com sepse neonatal precoce<sup>85</sup>.

Weitkamp et al. avaliou 23 RN prematuros e a termo com sinais clínicos de sepse e cultura de sangue positiva, comparando com características laboratoriais para identificar um valor prognóstico para evolução da doença. Concluiu que o *locus* de TNF não é marcador prognóstico para progressão de doença nos AT e PMT de alto risco com

cultura positiva admitidos nas UTIs Neonatais<sup>86</sup>.

Um estudo retrospectivo alemão, feito em 2006 por Schuler et al., com 67 RN prematuros e com sepse precoce comprovada, não conseguiu mostrar associação entre o *LTA* +252 e *TNF*-308 e o desenvolvimento de sepse<sup>87</sup>.

Na faixa etária pediátrica, excluindo os recém-natos, uma das primeiras associações entre o polimorfismo do *TNF* -308 e a sepse foi demonstrada em pacientes com meningococemia, uma doença grave, relativamente frequente em pediatria, de curso fulminante e associada com ativação rápida de inflamação sistêmica. Inicialmente, foi encontrada associação entre o alelo *TNF* -308 A e óbito tanto, nos homozigotos AA, quanto nos heterozigotos<sup>87</sup>. Read e Balding, anos mais tarde, tentaram reproduzir tais resultados, mas não conseguiram confirmar esta associação<sup>88-89</sup>.

Em 2009, Read e colaboradores, observaram associação positiva entre o alelo *TNF* -308 A e a susceptibilidade à doença meningocócica<sup>88</sup>, mas não identificaram a associação com óbito em uma coorte de 1321 pacientes com meningococemia comprovada, entre crianças e adultos, sendo 959 pacientes abaixo de 16 anos<sup>83</sup>.

Já um estudo realizado na Turquia, com 53 pacientes na faixa etária pediátrica (entre 0 e 15 anos), concluiu que os carreadores do alelo *TNF*-308 apresentaram risco 2,42 vezes maior de desenvolvimento de sepse grave e choque séptico, mas não houve associação com óbito<sup>90</sup>.

Uma recente meta-análise demonstrou associação entre o alelo *TNF* -308 A e a susceptibilidade à sepse (OR=2,15; p<0.01), porém relatou ausência de significância estatística para a associação deste SNP com óbito (OR=1,48; p=0.20). O artigo publicado por Teuffel et al. (2009) comparou estudos que incluíam pacientes com sepse primária causada por diferentes agentes etiológicos ou secundária a um evento inicial (trauma, queimadura ou cirurgias eletivas) sendo também comparadas populações de diferentes faixas etárias, e incluídos estudos em neonatos, crianças e adultos<sup>91</sup>.

Recentemente Härtel et al (2011) tentou confirmar esses resultados positivos em uma coorte alemã com 1944 recém-nascidos de muito baixo peso ao nascer, mas não encontrou nenhuma associação entre o polimorfismo *TNF* 308 G/A e sepse comprovada<sup>92</sup>.

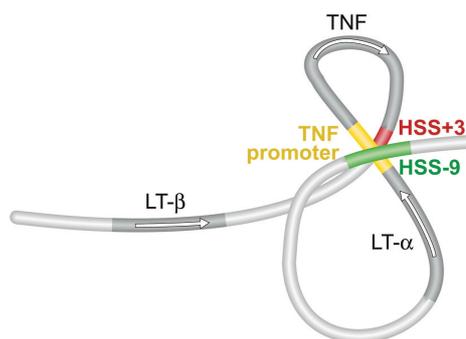
Concluindo, as diferenças entre adultos e crianças, principalmente recém-nascidos prematuros, precisam ser levadas em consideração nos estudos futuros com avaliação de risco para sepse nestes perfis.

Sabe-se que o gene do *TNF* localiza-se em uma região no interior do complexo HLA, densamente povoada por genes relacionados com a resposta inflamatória, incluindo o gene *LTA*, que codifica *TNF-β/LT-α*, sendo os polimorfismos nesta região caracterizados por um alto grau de desequilíbrio de ligação<sup>92</sup>. Tal fenômeno ocorre devido à proximidade desses marcadores, em conjunto com seu surgimento em data relativamente recente na escala evolutiva, o que resulta na sua transmissão em conjunto por longos períodos até a recombinação intra-HLA terminar por eliminar o desequilíbrio resultante. Portanto, um dado polimorfismo pode não estar diretamente causando a secreção aumentada de *TNF*, mas ser um marcador para algum outro fator genético relevante, muito próximo ao primeiro do ponto de vista físico e ainda em desequilíbrio de ligação na população<sup>84</sup>.

A associação haplotípica do alelo *LTA* +252 A com o alelo *TNF* -308 G é a mais frequente, uma vez que são estes os alelos mais frequentes em cada posição<sup>93</sup>. Por outro lado, um marcador associado com alguma doença, pode refletir o efeito de outro marcador também presente nesta região e funcionalmente importante. Torna-se imprescindível, portanto, a análise de desequilíbrio de ligação entre diferentes SNPs, a fim de evitar conclusões inadvertidas.

A Figura 2 demonstra a proximidade dos genes responsáveis pela codificação do *TNF* e da *LTA*.

**Figura 4 – Interações entre os genes TNF e LTA**



Reproduzido de Tsytsykova AV, Rajsbaum R, Falvo JÁ, Ligeiro F, Neely SR, Goldfeld AE. *Activation-dependent intrachromosomal interactions formed by the TNF gene promoter and two distal enhancers*. PNAS 2007; 104 (43): 16850-16855.

### 3.3.2 Linfotoxina-alfa (ou TNF- $\beta$ ) e *LTA* +252

Em contraste com o TNF- $\alpha$ , que é expresso predominantemente por macrófagos, TNF- $\beta$  (mais conhecido como linfotoxina- $\alpha$ ) é expresso e liberado predominantemente por linfócitos. Um polimorfismo já identificado do TNF- $\beta$  existe na posição 252 dentro do primeiro íntron do gene de TNF- $\beta$ , consistindo de um alelo majoritário G ( *TNF* +252 G) e um alelo alternativo A ( *TNF* +252 A, mencionado como "TNFB 2" na maioria dos estudos)<sup>94</sup>.

Indivíduos homocigotos para TNF- $\beta$  +252 A têm mostrado níveis elevados de TNF- $\alpha$  durante a sepse<sup>82,94</sup>. Por outro lado, polimorfismos nos genes de TNF- $\alpha$  e LT- $\alpha$ , incluindo *TNF*-308 e *LTA* +252, têm sido associados com produção significativamente mais elevada de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e TNF- $\alpha$ , e com a susceptibilidade à sepse e o prognóstico da sepse<sup>73,76,93</sup>.

Em recente metanálise, Tiancha et al (2011) avaliaram a associação entre a susceptibilidade à sepse e o polimorfismo *LTA* +252 A/G, e concluíram que o genótipo

AA, quando comparado com AG ou GG, foi significativamente associado à sepse, com OR de 1,33 (IC 95% 1.09-1.62,  $p = 0,006$ ), sendo também encontrada associação nos caucasianos com este alelo (OR 1.44, IC 95% 1.08-1.91,  $p = 0,01$ )<sup>95</sup>. Também foi descrita associação altamente significativa entre mortalidade por sepse e o genótipo *LTA*+252 AA (OR 2.47; 95% CI, 1.52-4.00,  $p = 0,001$ ), assim como o alelo A (OR 1.96; 95% CI, 1.37-2.79,  $p = 0,001$ ) em caucasianos<sup>95</sup>.

A metanálise fez análise estratificada para avaliar os fatores de confundimento e descobriu-se que houve diferença significativa entre os subgrupos. Também foi analisado o impacto global da qualidade metodológica dos estudos incluídos, que teve implicações para os resultados obtidos. Além disso, poucos estudos relataram genotipagem feita às cegas, e ajuste para fatores de confundimento, especialmente aqueles em sepse relacionada com a mortalidade. Alguns não eram consistentes com HWE. Em segundo lugar, a associação focalizou apenas a associação entre *LTA* +252 e sepse. É muito provável que outras variações genéticas também tenham influência sobre o risco de sepse e a mortalidade resultante<sup>96</sup>. Por exemplo, o gene *LTA* é conhecido para estar em desequilíbrio de ligação com o *TNF- $\alpha$* . Em terceiro lugar, populações de diversas faixas etárias foram incluídas.

Outro fator limitante foram os grupos controle, que não foram examinados de forma consistente através dos estudos. Muitos estudos tiveram vieses que podem ter influenciado o prognóstico. Infecções adquiridas na comunidade e sepse nosocomial foram incluídas. Para a sepse nosocomial havia muitos fatores de confundimento, incluindo co-morbidades, tempo de internação e cirurgia, etc. Havia também diferenças na natureza dos patógenos envolvidos. O polimorfismo *LTA* +252 tem um efeito mais importante na sepse por germes Gram+, em comparação com Gram-<sup>97</sup>.

A relação entre o polimorfismo *LTA* +252 A/G e a sepse deve ser interpretada com cautela, pois vários fatores, como idade, etnia, natureza dos agentes patogênicos e

gravidade da sepse, estão intimamente relacionados com a susceptibilidade à sepse ou prognóstico da sepse, e podem não ter sido analisados de forma adequada nos diferentes estudos disponíveis.

### 3.3.3 IL-1 e *IL-1ra*

IL-1 é uma citocina pró-inflamatória secretada precocemente na resposta a muitos patógenos, e desempenha papel importante na patogênese da sepse e choque séptico. É capaz de estimular a produção de prostaglandinas e NO, que estão entre os mediadores da vasodilatação observada na sepse<sup>98</sup>.

Em contraste, o *IL-1ra* é um inibidor que age via competição da ligação da IL-1 a seus receptores de superfície celular, mas sem possuir atividade agonista<sup>99-100</sup>.

Os níveis séricos de IL-1 e o *IL-1ra* são elevados em pacientes com doença meningocócica e parecem ser mais elevados em pessoas com uma doença mais grave<sup>101</sup>. Os genes que codificam para *IL-1 $\alpha$*  e *IL-1 $\beta$*  e *IL-1Ra* estão agrupados no cromossomo 2, e vários polimorfismos foram descritos nestes *loci*.

Vários destes polimorfismos já foram examinados quanto à associação com a susceptibilidade e o prognóstico de sepse, e o alelo variante mais estudado é o A2, no gene *IL-1RA*. Uma maior frequência do alelo A2 foi demonstrada em adultos brancos com sepse grave, quando comparada com a frequência em uma população saudável branca<sup>102</sup>. Não houve associação entre esse alelo e a mortalidade por sepse nesta população.

### 3.3.4 Interleucina-6 e *IL-6 -174*

A IL-6 é uma importante citocina inflamatória<sup>103</sup>, cujos níveis elevados são

associados com um aumento na ocorrência de choque séptico e morte em pacientes com sepse<sup>104</sup>. IL-6 tem efeitos estimulantes sobre linfócitos B e T, e está envolvida na indução da febre e na síntese hepática de proteínas de fase aguda. Os níveis séricos de IL-6 têm sido correlacionados com a gravidade e o desfecho da sepse<sup>105-107</sup>.

A região promotora do gene para a IL-6 abriga vários SNP<sup>77</sup>, sendo o mais estudado o polimorfismo regulatório, relativamente comum, resultante da substituição de um alelo G por C na posição -174 na região promotora. Em adultos saudáveis, o alelo G é associado com maiores níveis séricos de IL-6<sup>108</sup>. No entanto, em pacientes adultos cirúrgicos sépticos, não houve associação entre os genótipos e níveis séricos de IL-6, e nem houve uma diferença significativa na distribuição dos vários genótipos possíveis entre pacientes criticamente doentes e controles saudáveis, ou entre pacientes com ou sem sepse<sup>106</sup>. Isto pode sugerir que a polimorfismo *IL-6* -174 G/C não está associado a um aumento da susceptibilidade à sepse. A frequência significativamente menor do genótipo GG foi demonstrada em pacientes sépticos não sobreviventes, quando comparado com sobreviventes sépticos, sugerindo que o genótipo GG foi de algum modo protetor, porém o número de pacientes deste grupo era pequeno.

Em monócitos isolados de recém-nascidos com o alelo C na posição *IL-6* -174, a resposta estimulada por LPS é maior do que a observada em monócitos isolados de portadores do alelo G<sup>109</sup>, ou seja, o oposto do que foi relatado em adultos. Neste grupo etário, o alelo C também parece estar associado com um aumento maior da IL-6 durante uma resposta inflamatória aguda. Este achado pode ser explicado por mudanças na resposta imune, que ocorrem durante o desenvolvimento.

No entanto, ao contrário da associação de pior prognóstico com os indivíduos que produzem níveis elevados de TNF- $\alpha$ , é o alelo G, associado com baixos níveis de IL-6, que parece estar associado com septicemia em recém-nascidos prematuros.

A presença do genótipo GG foi mais frequente em prematuros < 32 semanas de

gestação com sepse, quando comparada com crianças prematuras sem sepse, sugerindo um benefício de proteção do desenvolvimento da nos pacientes com o alelo C<sup>110</sup>.

### 3.3.5 Interleucina-10 e *IL-10* -1082

A resposta inflamatória desproporcional (“*overzealous*”) e os efeitos potencialmente nocivos de muitos dos mediadores inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ , são contrabalançadas por citocinas anti-inflamatórias, tais como a IL-10<sup>111-112</sup>. A IL-10 é produzida primariamente por monócitos e suprime a expressão de citocinas, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e - $\beta$ , IL-6 e IL-8 por células T-*helper*<sup>113-114</sup>.

Os efeitos anti-inflamatórios de IL-10 foram demonstrados em modelos animais de sepse, nos quais a neutralização de IL-10 resulta em uma resposta pró-inflamatória exagerada e morte, enquanto a administração de IL-10 confere proteção<sup>111,115,116</sup>.

No entanto, tem sido proposto que o aumento da expressão da IL-10 na sepse bacteriana pode induzir à imunossupressão, e aumentar a mortalidade por interferir com a eliminação das bactérias<sup>117-118</sup>.

IL-10 parece ser regulada principalmente no nível transcricional, sendo 3 SNPs no sítio de início da transcrição, em posições -1082 (G para A), - 819 (C para T), e -592 (C para A), localizados na região regulatória 5' capazes de controlar a transcrição do gene de IL-10<sup>119-121</sup>.

Níveis séricos elevados de IL-10 foram demonstrados em adultos com pneumonia adquirida na comunidade e estão correlacionados com a gravidade da doença<sup>123</sup>. Os investigadores examinaram se os polimorfismos genéticos na região reguladora do gene para IL-10 estão associados com a sepse, com resultados conflitantes. O alelo G (“forte secretor”) na posição -1082 foi associado a doença mais grave, quando comparado com o

alelo "fraco secretor" em uma coorte de adultos com pneumonia adquirida na comunidade<sup>123</sup>. Em uma coorte de pacientes com doença pneumocócica comprovada em hemocultura, 54% dos pacientes que desenvolveram choque séptico eram portadores do alelo G e apresentavam maior secreção de IL-10, enquanto apenas 16% dos pacientes que não desenvolveram choque séptico tinham esse alelo<sup>123</sup>. Quanto ao SNP *IL-10* -592, não houve um risco aumentado de sepse em coorte dos adultos em estado crítico. Nesses pacientes com o alelo *IL-10* -592 "fraco secretor", a mortalidade foi mais elevada, quando comparados com aqueles com o alelo C, independentemente de terem sido preenchidos os critérios de sepse<sup>125</sup>.

Em contraste, Reid<sup>126</sup> et al (2002) não observou associação entre os haplótipos de *IL-10* (e nem os níveis séricos de *IL-10*) e a mortalidade em uma coorte de adultos de uma UTI com uma grande variedade de diagnósticos cirúrgicos e problemas traumáticos. Estes resultados contraditórios podem ser devidos aos pacientes incluídos; por exemplo, todos os pacientes incluídos no estudo por Schaaf et al<sup>124</sup> tinham um processo em curso, enquanto no estudo feito por Reid et al tinham uma variedade de doenças com etiologias diversas, incluindo não-infecciosas.

Assim, estudos de associação entre os polimorfismos regulatórios na região promotora do gene que codifica a *IL-10* são um tanto conflitantes. Por um lado, parece haver um aumento no risco de doença mais grave (desenvolvimento de choque séptico) em indivíduos que têm o genótipo GG secretor alto no alelo 1082, mas por outro lado há uma maior mortalidade em indivíduos com a genótipo secretor baixo no locus 592<sup>10</sup>.

### **3.3.6. CD14 e TLR4, e seus SNPs**

Infecção devida a microorganismos Gram- é uma causa importante de septicemia

e choque séptico. CD14 e TLR-4 são parte do mecanismo de reconhecimento e de resposta ao LPS.

O CD14, um receptor de superfície, é um importante elemento na sequência de ativação de monócitos e macrófagos por bactérias Gram-, induzida pelo reconhecimento de endotoxinas bacterianas. A clivagem enzimática de CD14 presente na membrana celular também libera um fragmento solúvel (sCD14), que pode ligar-se à endotoxina circulante, reduzindo assim sua atividade biológica.

Um sítio polimórfico com substituição de C por T numa posição 159 nucleotídeos acima do sítio de iniciação da transcrição (260 nucleotídeos acima início da tradução)<sup>127-129</sup> foi identificado na região promotora do gene CD14. O alelo T minoritário mostra aumento da atividade transcricional em estudos de casos<sup>130</sup>, e, como previsto, os indivíduos homocigotos para este alelo têm níveis aumentados de CD14<sup>128,129,131</sup>.

Os estudos realizados para verificar se o sítio polimórfico 159 está associado com infecção ou sepse têm resultados conflitantes<sup>132-134</sup>, que podem ser devidos à ausência de qualquer associação de CD14 com sepse, ou às diferenças inerentes aos estudos, tais como o número de pacientes analisados, origem da infecção (cirurgia, trauma, pneumonia), ou à heterogeneidade dos pacientes<sup>10</sup>.

### **3.3.7. Enzima Conversora de Angiotensina e ECA I/D**

A enzima conversora de angiotensina I (ECA) é encontrada no epitélio e células endoteliais, é a principal responsável da conversão da angiotensina I em II. A ECA

também está envolvida no metabolismo de peptídeos quimiotáticos, sugerindo que pode desempenhar um papel na resposta inflamatória. Indivíduos apresentam variabilidade nos níveis plasmáticos e teciduais de ECA, e as evidências sugerem que ambas as variações são devidas, em parte, a fatores genéticos<sup>135</sup>. Especificamente, a inserção (I) / deleção (D) de uma sequência não codificante de 287 pares de bases no íntron 16 do gene para a ECA<sup>136</sup> está associada com níveis plasmáticos variáveis; com o genótipo DD, estão associados níveis de ECA no plasma e no tecido mais elevados do que encontrados em homozigotos e heterozigotos carregando o alelo I.<sup>137-138</sup> O mecanismo pelo qual a deleção desta sequência é associada com níveis aumentados da ECA é ainda controverso<sup>139-140</sup>, mas pode envolver regulação da transcrição<sup>141</sup>.

Alguns estudos examinaram a associação entre o polimorfismo I / D da ECA e a sepse. Em um estudo, o genótipo D/D esteve associado com doença meningocócica grave em crianças, e com maior prevalência em pacientes que usaram suporte inotrópico e ventilação mecânica, mostrando-se preditivo de maior tempo de permanência na UTI e de mortalidade<sup>142</sup>. Adicionalmente, a frequência do genótipo D/D foi mais frequente nas crianças que foram a óbito do que nos sobreviventes, embora não alcançando significância estatística<sup>142</sup>.

Mais recentemente, não foi observada diferença significativa na suscetibilidade à septicemia, ou à mortalidade associada à sepse, em uma coorte de crianças em ventilação mecânica com peso ao nascer <1500 g<sup>143</sup>. Em uma coorte de pacientes adultos internados em UTI, o genótipo DD foi mais frequente encontrado nos pacientes com SDRA comparados com os pacientes sem SDRA em UTI. Uma vez SDRA desenvolvido, a mortalidade foi mais elevada nos pacientes com o genótipo D, sugerindo um papel patogênico importante para ECA<sup>144</sup>.

### 3.3.8. Inibidor do Ativador de Plasminogênio do tipo I (*PAI-1*)

Acredita-se que a patogênese da falência múltipla de órgãos na sepse envolva disfunção endotelial e deposição intravascular de fibrina<sup>145</sup>. A atividade diminuída de anticoagulantes, ou os níveis elevados de inibidores da fibrinólise, podem levar à deposição de fibrina e contribuir para a falência de múltiplos órgãos.

*PAI-1* é inibidor primário dos ativadores fisiológicos do plasminogênio (responsável pelo início da fibrinólise). Altas concentrações plasmáticas de *PAI-1* têm sido observados na sepse<sup>146</sup>, meningite grave<sup>147</sup> e estão correlacionadas com um pior prognóstico.

Um polimorfismo envolvendo a inserção ou deleção de um único nucleotídeo dentro da região promotora parece influenciar a produção de *PAI-1*. Indivíduos homozigotos para uma sequência envolvendo quatro guaninas (4G/4G) produzem mais *PAI-1* do que os heterozigotos (4G/5G) ou homozigotos para 5 guaninas (5G/5G)<sup>148</sup>.

Em uma grande coorte de crianças com doença meningocócica, o genótipo 4G/4G teve elevados níveis plasmáticos de *PAI-1*, e um aumento no risco de morte por sepse, em comparação com crianças com genótipos 4G/5G ou 5G/5G<sup>149</sup>. Indivíduos com doença meningocócica cujos parentes de primeiro grau eram portadores do genótipo 4G/4G também parecem estar em um maior risco para o desenvolvimento de choque séptico, em vez de meningite<sup>150</sup>. Finalmente, em uma coorte de pacientes adultos traumatizados, aqueles com o genótipo 4G/4G apresentaram concentrações plasmáticas mais elevadas de *PAI-1* em comparação com indivíduos com os demais genótipos<sup>151</sup>. Assim, parece haver uma forte associação entre o genótipo *PAI-1*- 4G/4G, concentrações plasmáticas elevadas de *PAI-1* e pior prognóstico na sepse.

### 3.3.9. Lectina Ligadora de Manose (MBL)

Lectina Ligadora de Manose (MBL) é uma molécula do Sistema Complemento envolvida na resposta imediata<sup>152</sup> a patógenos. Possui dois papéis na defesa imunitária: 1) está envolvida com a opsonização bacteriana, devido à sua capacidade de se ligar nos oligossacarídeos N-acetil glicosamina e manose<sup>153</sup> na superfície das bactérias; 2) a ligação de MBL associada com serina-proteases leva à ativação do Complemento, independentemente do anticorpo<sup>154</sup>. Deficiências em MBL têm sido associadas com o aumento da susceptibilidade à infecções<sup>155</sup>.

Sítios polimórficos resultam em alterações de aminoácidos que interferem com a polimerização, resultando em aumento na degradação de MBL<sup>152,156,157</sup> e redução de níveis séricos de MBL<sup>156</sup>.

Estudos têm demonstrado associação entre polimorfismos genéticos no gene MBL e hospitalizações por infecções em crianças<sup>158</sup>, número de infecções respiratórias agudas em crianças<sup>159</sup>, risco aumentado para infecções meningocócicas<sup>160</sup>, susceptibilidade a infecções em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico<sup>161</sup>, e risco aumentado para infecções respiratórias<sup>162</sup> recorrentes.

Recentemente, uma revisão sistemática sobre o papel da MBL na infecção neonatal mostrou resultados contraditórios em relação ao genótipo MBL2 e infecção. Recém-nascidos com baixos níveis de MBL apresentaram maior frequência de sepse confirmada quando comparada com RN com níveis normais de MBL<sup>163</sup>.

Um nível baixo de MBL pode parecer ser um fator de risco para sepse neonatal, mas antes que o nível MBL possa ser adicionado ao painel de medidas de risco de sepse em RN, a associação precisa de ser confirmada em um ensaio multicêntrico grande com melhor definição de baixos níveis de MBL<sup>163</sup>.

### 3.3.10. Selectinas

Moléculas de adesão desempenham um papel crucial na migração e ativação leucocitária durante a fase inicial da resposta imune. Selectinas são proteínas que medeiam a ligação inicial dos leucócitos às células endoteliais. Este processo é o primeiro passo na cascata de aderência que culmina no extravasamento de leucócitos até o sítio de inflamação, dano ou infecção<sup>164</sup>. Existem 3 tipos de Selectinas: a *E-Selectina* é exclusivamente expressada nas células endoteliais em resposta a um estímulo inflamatório<sup>165</sup>; a *P-selectina* é armazenada nas plaquetas e células endoteliais, e é translocada para a superfície da célula após a ativação; a *L-selectina* é expressa em leucócitos<sup>166</sup>.

Além do estímulo inflamatório, polimorfismos genéticos também podem ter um impacto na expressão de selectinas e, indiretamente, sobre a suscetibilidade dos pacientes à doença. O polimorfismo *Ser128Arg* no gene da *E-Selectina* leva à alteração da sequência de aminoácidos. O estado de portador do alelo variante (*Arg128*) está associado com uma aderência deficiente de leucócitos a células endoteliais<sup>167-168</sup>, tendência exacerbada à coagulação<sup>169</sup> e gravidade da doença aterosclerótica<sup>170</sup>.

O polimorfismo *Thr715Pro* da *P-selectina* nos portadores do alelo mutante (*Pro715*) está associada com níveis reduzidos de *P-selectina* sérica solúvel<sup>171</sup> e proteção contra infarto do miocárdio<sup>172</sup>.

A alteração de expressão destas selectinas também podem contribuir para o nascimento prematuro e desempenham um papel em algumas complicações pós-natais, especialmente na sepse e displasia broncopulmonar (DBP). Assim, existe uma possível associação entre polimorfismos de selectina e parto prematuro, bem como risco de sepse e DBP em prematuros<sup>10</sup> com baixo peso ao nascer.

Em conjunto, a partir dessa amostragem da literatura, podemos constatar que existem poucos estudos na infância e que outras investigações devem ser feitas com um maior número de pacientes para determinar a importância desses polimorfismos genéticos na evolução da sepse grave.

### **3.4 Implicações para a prática médica**

Apesar de muitos esforços no entendimento na fisiopatogenia e fatores de risco a respeito da susceptibilidade à infecções, há ainda a necessidade de uma nova abordagem que identifique as associações causais entre fatores ambientais pré e pós natais, modificações de longo prazo na regulação epigenética (influência de fatores dos meios interno e externo sobre o funcionamento dos genes) e doenças, o que permitirá intervenções específicas em fases iniciais da vida que conduzam à melhoria da saúde humana<sup>173</sup>.

Nesse contexto, avanços no conhecimento do genoma humano e a convergência tecnológica envolvendo a biologia e genética, são os alicerces da investigação de mecanismos moleculares no desenvolvimento de doenças, e nas características genéticas de cada paciente, considerado como um indivíduo único, possibilitando que as intervenções ocorram antes da constatação da doença. Estudos prospectivos de coortes em comunidades selecionadas com marcadores genéticos, podem ajudar identificar fatores genéticos com impacto significativo sobre a susceptibilidade a doenças complexas<sup>174</sup>.

Em linhas gerais, os principais requisitos para a efetiva aplicação clínica da genômica em Pediatria envolvem plataformas de vazão suficiente para a detecção de polimorfismos genéticos e o estudo da expressão gênica em larga escala; repositórios de

material biológico articulados com bancos de informações clínicas e populacionais e com serviços ambulatoriais e hospitalares; e programas de ensino e treinamento em genômica clínica para estudantes e profissionais da saúde<sup>175</sup>.

Após a conclusão do Projeto Genoma Humano, instituições como *Children's Hospital Boston* e *Children's Hospital of Philadelphia* construíram centros dedicados à genômica clínica com o intuito de estudar interações entre genes e ambiente, e identificar os componentes genéticos e ambientais nas doenças multifatoriais. Esses programas têm operado em duas linhas principais: i) estudos de polimorfismos de DNA e de variações estruturais no genoma para identificar indivíduos com risco aumentado de desenvolver determinada doença<sup>176</sup>; ii) estudos de expressão gênica para esclarecer o mecanismo molecular das doenças e para a obtenção de marcadores genômicos de diagnóstico, prognóstico e avaliação da resposta a agentes terapêuticos<sup>177</sup>.

Entenda-se desta descrição que os custos são muito elevados, porque plataformas de alta vazão pressupõem equipamentos de última geração, operados por profissionais de considerável especialização, numa base permanente, ou seja, os custos de pessoal e de manutenção aumentam consideravelmente o investimento em equipamento e instalações. A recomendação de se conduzir estudos em tipagem de DNA (detecção de polimorfismos gênicos) e em detecção de RNA (estudos de expressão gênica) implica em aumento considerável de custos, já que essas áreas de estudo utilizam recursos materiais (equipamentos, reagentes) que lhes são próprios, e, no caso de RNA, precauções técnicas adicionais. A isto se somam todos os custos ligados à informatização, visto que o uso de uma plataforma como esta e a consulta a bancos de dados genéticos pressupõem recursos e competências informáticas que não estão necessariamente disponíveis em qualquer instituição.

O investimento em tal capacitação institucional tem sua justificação no sucesso desta abordagem em várias áreas da Medicina. A obtenção de biomarcadores para

diagnóstico, prognóstico e identificação de alvos terapêuticos através do estudo da expressão gênica mostrou-se de grande utilidade no diagnóstico, prognóstico e orientação terapêutica, por exemplo, na Oncologia, já sendo uma realidade na prática clínica em países desenvolvidos, embora não necessariamente disponível em qualquer centro hospitalar. No Brasil, a implantação de recursos tecnológicos desta ordem, mesmo que restrita aos serviços de Oncologia, não acompanha ainda a tendência internacional, o que reflete a desigualdade social e o acesso ainda limitado de grande parte da população a recursos modernos de diagnóstico e tratamento<sup>178</sup>.

Tais considerações acarretam que a capacitação em genômica clínica, aplicada a qualquer área da Medicina, de uma instituição brasileira, exige considerações adicionais, tendo em vista os custos muito elevados, as desigualdades regionais e institucionais, as carências de formação de pessoal técnico em metodologias avançadas, as dificuldades de absorção de tais profissionais em um serviço de saúde que é, em grande parte, mantido pelo Estado, e as diferenças marcantes entre instituições primárias, secundárias e terciárias de Saúde, sendo essas últimas as únicas com perfil compatível com estas ambições.

Na área da disciplina de Pediatria Neonatal, a Genômica Pediátrica poderá dar suporte ao manejo das infecções neonatais, principal causa da mortalidade neonatal tardia. Tal perspectiva é sugerida por dados da literatura<sup>179</sup>, relativos à caracterização de polimorfismos em genes ligados à resposta imune natural que influenciam a evolução da resposta à terapia na sepse.

Contudo, mesmo a aplicação do conhecimento já existente à Genômica Pediátrica não é apenas limitada por considerações de custo, existem problemas científicos por resolver, que não são necessariamente os mesmos relevantes no contexto da clínica oncológica. O principal é a fundamentação científica da busca de qualquer marcador individual no contexto da prática clínica, fundamentação esta que é ainda mais relevante

quando há urgência na tomada de decisões, como é o caso da sepse neonatal. Que existem muitos marcadores candidatos, com impactos variáveis sobre os desfechos relevantes, não há dúvida. O problema, ainda não resolvido, é quais biomarcadores deveriam ser rotineiramente avaliados em nossos pacientes, a cada vez que o diagnóstico de sepse neonatal se apresenta.

O biomarcador ideal seria aquele cuja determinação pudesse ser feita rapidamente e de forma altamente reprodutível, e que tivesse um impacto demonstrável sobre o prognóstico, de magnitude suficiente para fazer uma diferença na prática clínica. Se um único marcador não atende a esses critérios, combinações de biomarcadores poderiam ser utilizadas com esta finalidade. Nestas condições, no entanto, a cada novo biomarcador que entre no processo de avaliação, crescem os custos, o tempo necessário para a realização dos testes, e, principalmente, o tempo de análise necessário para interpretação dos mesmos e definição de uma conduta. Em outras palavras, quanto maior o número de marcadores genéticos com impacto moderado, menos eficiente é a tradução do conhecimento em decisão clínica, e menos justificável é o investimento institucional.

Não é possível resolver este impasse sem uma consulta aprofundada à literatura especializada, com vistas a responder a uma pergunta clara: *já estão bem estabelecidos os biomarcadores que podem fundamentar o prognóstico na sepse neonatal, e quais são eles?*

Finalmente, é igualmente importante responder à questão da viabilidade de uma estrutura avançada de genômica clínica aplicada à sepse neonatal em nossas condições institucionais. Mesmo que o conhecimento científico exista para justificar o investimento, a nossa realidade institucional permite ?

O Instituto Fernandes Figueira (IFF) é uma unidade de Assistência, Ensino, Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), conveniada ao Sistema Único de Saúde (SUS), que tem como missão melhorar a qualidade de vida,

promovendo a saúde da mulher, da criança e do adolescente.

O Departamento de Neonatologia do IFF assessora e apoia o Ministério da Saúde no desenvolvimento do cuidado neonatal em 42 maternidades em todo o país, coordena sistema de monitoramento e pesquisa em 16 serviços universitários da Rede Brasileira de Pesquisas Neonatais (RBPN) e faz parte da Rede Brasileira de Avaliação de Tecnologia em Saúde (Rebrats).

A qualidade da atenção nesta área de atuação pode ser aprimorada com a necessidade de formação de pesquisadores nesta área do conhecimento. Neste contexto, observa-se que o número de estudos clínicos em crianças ainda é pequeno quando comparado ao número de estudos em adultos. Por outro lado, muitos destes marcadores biológicos ainda necessitam comprovar sua efetividade no diagnóstico da sepse, a fim de justificar todo o investimento oneroso na realização de grandes coortes prospectivas na faixa etária neonatal.

Ao todo, o IFF dispõe de 114 leitos, 20 deles reservados aos recém-nascidos internados nos berçários de alto risco e intermediário e 7 para os RN cirúrgicos. A Unidade de Pacientes Graves (UPG) possui capacidade de 6 leitos e atende pacientes na faixa etária de 1 mês a 17 anos de vida, portadores das mais variadas patologias clínicas e cirúrgicas a partir da demanda interna dos ambulatórios de pediatria e de especialidades pediátricas, enfermarias de pediatria e cirurgia, centro cirúrgico, Berçário de Alto Risco e Unidade Intermediária ou pela demanda externa proveniente da rede de assistência do SUS cujos pacientes são referidos pela central de regulação de vagas ou pela solicitação direta de profissionais de saúde das unidades públicas ou, em menor proporção, pelas unidades privadas.

No cenário de convergência tecnológica que caracteriza a Medicina moderna, é essencial a formação de equipes multidisciplinares capacitadas a atuar num ambiente de

contínua inovação. A introdução da Genômica na prática pediátrica faz parte desse processo de formação.

A partir de 2003 um projeto sobre biomarcadores vêm sendo desenvolvido na UPG/IFF intitulado: *“Avaliação respiratória, metabólica e parâmetros inflamatórios em crianças submetidas à ventilação mecânica na Unidade de Pacientes Graves do IFF-Fiocruz. Desenvolvimento de protocolos clínicos para evidenciar marcadores prognósticos”*, sob a gerência de Dra. Zina Maria Almeida de Azevedo, coordenadora-médica da UPG/IFF. Já trabalham nesta Unidade ou em parceria com outras unidades da FIOCRUZ, profissionais com formação e experiência em delineamentos de estudos clínicos, epidemiologia, análise de dados e economia em saúde, em apoio aos grupos de pesquisa existentes como é o caso do Laboratório de Fisiopatologia Humana (IFF/Fiocruz) onde são realizados estudos de genotipagem e outras análises laboratoriais e conta com a colaboração e apoio do Laboratório de Hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) onde as amostras processadas são submetidas a estudos moleculares.

Tendo em vista o exposto acima, é importante avaliar se estudos de caracterização do impacto de polimorfismos sobre o prognóstico da sepse neonatal já podem ser conduzidos, de forma produtiva, em nossa instituição, tomando como base a atuação conjunta dos vários setores (UPG, Neonatologia, Fisiopatologia Humana) e a informação já gerada por eles até o momento.

No presente estudo, procuramos responder a essas questões, através do levantamento de referências e informações já disponíveis na comunidade científica e da avaliação de dados sobre pacientes neonatais já disponível em banco de dados genotípicos da Instituição.

## **HIPÓTESE DE ESTUDO**

A tipagem de polimorfismos gênicos pode ajudar a identificar precocemente pacientes em maior risco de desfechos graves resultantes de infecção, durante o período neonatal, no ambiente hospitalar em contexto de terapia intensiva.

## **OBJETO DE ESTUDO**

Aplicabilidade ao prognóstico da sepse neonatal, e das suas complicações, da análise de polimorfismos gênicos envolvendo genes que codificam citocinas e outras proteínas relevantes para a resposta inflamatória e a imunidade inata.

## **OBJETIVO GERAL**

Avaliar a aplicabilidade da análise de polimorfismos gênicos envolvendo genes que codificam citocinas, e outras proteínas relevantes para a resposta inflamatória e a imunidade inata, ao prognóstico da sepse neonatal e suas complicações, com base na literatura especializada e no estudo de pacientes atendidos no Instituto Fernandes Figueira.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1 Verificar se a literatura científica especializada já permite definir um conjunto de polimorfismos com valor prognóstico bem estabelecido, que possam ser aplicados sistematicamente à avaliação de risco de sepse e suas complicações em pacientes atendidos em UTI neonatal no Instituto Fernandes Figueira.

2 Levantar os dados já existentes sobre polimorfismos de possível valor prognóstico, em pacientes atendidos em UTI neonatal no Instituto Fernandes Figueira.

## METODOLOGIA

### 5.1 - Natureza e contexto institucional da pesquisa

Este estudo é vinculado a um projeto maior sobre biomarcadores em sepse que vêm sendo desenvolvido na UPG/IFF desde 2003, intitulado: *“Avaliação respiratória, metabólica e parâmetros inflamatórios em crianças submetidas à ventilação mecânica na Unidade de Pacientes Graves do IFF-Fiocruz. Desenvolvimento de protocolos clínicos para evidenciar marcadores prognósticos”*, coordenado pela Dra. Zina Maria Almeida de Azevedo, da Unidade de Pacientes Graves, Depto. de Pediatria, Instituto Fernandes Figueira, FIOCRUZ. O projeto foi atualizado em 2009 e aprovado com registro CAAE 0032.0.008.000-09 sob o título *“Validação de protocolos clínicos para evidenciar marcadores prognósticos para o paciente pediátrico crítico”*.

Pelas razões detalhadas acima, na seção final do referencial teórico, a pesquisa foi, necessariamente, conduzida em dois planos completamente distintos. Primeiramente, foi feito um esforço de responder, o mais criteriosamente possível, a uma questão clara: a literatura científica internacional nos oferece, hoje, de forma incontestável, um conjunto de informações que justifiquem o esforço de montagem e aplicação de uma bateria de testes moleculares a pacientes em risco de sepse, no contexto de internação em UTI neonatal? Se a resposta é positiva, quais os testes que devem ser implementados, e o que se espera dos resultados obtidos?

Em seguida, baseando-nos no conteúdo desta mesma literatura científica internacional, foi feito um esforço de responder a outra questão igualmente clara e importante: qual a realidade, hoje, da nossa instituição, no referente à estruturação e aplicação de tais testes, especialmente em comparação com a retratada em estudos feitos em grandes centros internacionais?

A primeira pergunta só pode ser respondida por um exame cuidadoso das publicações sobre o assunto, e necessariamente é abordada através de métodos de *revisão sistemática*, nos quais possamos ter acesso a detalhes sobre os estudos primários e as instituições de pesquisa que os conduziram.

A segunda, em contraste, só pode ser respondida por exame detalhado dos *prontuários de pacientes*, incluindo toda a informação clínica e genética disponível, que nunca foi publicada, de uma forma que nos permita avaliar até que ponto nossa instituição está capacitada a conduzir estudos como os executados em outros centros internacionais sobre o mesmo assunto.

Esta dicotomia de propósitos se reflete numa clara separação entre os métodos utilizados nas duas fases do estudo, que serão detalhados separadamente.

## **5.2 - Revisão sistemática da literatura**

Realizamos uma busca de evidências na literatura para determinar quais SNPs já identificados e estudados no período neonatal e quais os estudos de associação com a sepsis, já realizados nesta faixa etária. A busca de evidências seguiu as quatro etapas seguintes:

### **5.2.1 Busca dos estudos primários.**

Foi realizada a busca de forma sistemática na literatura, através da base de dados eletrônicos de registros de ensaios clínicos PubMed Medline, com os limites para estudos “humans”; “newborn : birth-1month”. Outras bases de dados que contêm artigos não publicados, teses ou projetos de pesquisa não foram consideradas. Foram utilizados os seguintes descritores no indexador de assuntos médicos (MeSH): “neonate or premature or VLBW or LBW ”; “sepsis or neonatal infections”; “polymorphism or polymorphisms or genetic variability or polymorphism or genotype”. A última busca

finalizada foi realizada em janeiro de 2012. Foram analisadas referências em inglês, espanhol e português. Já os artigos em Polonês e Chinês (este com abstract em inglês) foram excluídos.

Para o fluxograma de busca foram utilizados sucessivamente os descritores:

- “neonate or premature or VLBW or LBW ” com os limites “humans”; “newborn : birth-1month”
- “sepsis or neonatal infections” “neonate or premature or VLBW or LBW ” com os limites “humans”; “newborn : birth-1month”
- “polymorphism or polymorphisms or genetic variability or polymorphism or genotype” com os limites “humans”; “newborn : birth-1month”
- “neonate or premature or VLBW or LBW ” AND “sepsis or neonatal infections” AND “polymorphism or polymorphisms or genetic variability or polymorphism or genotype” com os limites “humans”; “newborn : birth-1month”

### **5.2.2 Seleção dos estudos localizados com base nos critérios de inclusão e exclusão**

A seleção dos trabalhos para análise detalhada foi realizada independentemente por dois avaliadores, com formação em Alergia e Imunologia e experiência em Neonatologia. O critério de inclusão foi: estudos que avaliaram o impacto da variabilidade genética na sepse em recém nascidos ou prematuros de baixo peso ao nascer. Os critérios de exclusão foram: artigos que continham relatos de caso; estudos sem avaliação da sepse como desfecho; revisões metodológicas; artigos relativos à faixa etária não-neonatal; estudos de diversidade genética de microorganismos; estudos sobre a diversidade de técnicas; e quaisquer outros artigos recuperados nas buscas que não se

enquadram no critério de inclusão. Todos os estudos identificados na busca inicial tiveram seus resumos avaliados; após a eliminação das referências que não se enquadravam nos critérios de inclusão, foi feita a análise dos artigos na íntegra, sempre que os mesmos estivessem acessíveis.

### 5.2.3 Avaliação da qualidade dos estudos incluídos

Dos estudos selecionados todos foram avaliados integralmente. Analisamos a qualidade da literatura publicada, baseando-nos numa série de padrões metodológicos para a avaliação em pesquisa molecular genética, com base estabelecida por princípios de epidemiologia clínica<sup>180</sup>.

Adicionalmente, através de critérios pré-definidos, avaliamos criticamente cada publicação, com vistas a detectar eventuais problemas na condução e interpretação de tais estudos<sup>181</sup>.

Nesta etapa, nosso principal objetivo foi identificar se as conclusões de cada trabalho apóiam ou não a suposição de que a tipagem dos genes de interesse já fundamenta, de forma bem-estabelecida, o uso sistemático para o prognóstico de sepse neonatal e suas complicações.

Os **24 estudos incluídos** foram avaliados em relação de 7 (sete) normas metodológicas para a ciência epidemiológica e clínica definida por Bogardus e colaboradores que incluíram: reprodutibilidade, objetividade, delimitação dos casos, a adequação do espectro no grupo caso, delineamento do grupo de comparação, a adequação do grupo de comparação e resumo quantitativo<sup>180</sup>.

### **5.3.6 Análise e interpretação dos dados**

A análise dos dados de cada uma das referências selecionadas é apresentada de forma descritiva, resumindo as evidências apresentadas, e levando em conta a clareza das medidas de resultado, a adequação dos métodos de análise, as informações sobre conflitos de interesse, e a coerência entre os resultados e as conclusões e/ou recomendações.

## **5.4 Estudos de pacientes**

### **5.3.1 Local de realização do estudo**

O IFF foi a instituição onde foram acompanhados todos os indivíduos estudados, coletadas as amostras e registrado em banco de dados previamente existente com informações clínicas dos pacientes incluídos no estudo.

Para estudos de genotipagem e outras análises laboratoriais, amostras coletadas e processadas no Laboratório de Fisiopatologia Humana (IFF/Fiocruz) e submetidas a estudos moleculares no Laboratório de Hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).

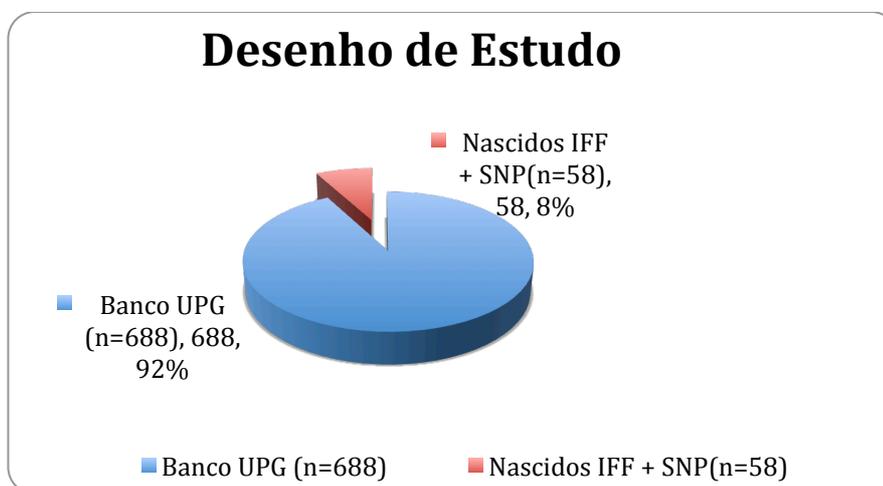
### **5.3.2 Desenho do estudo**

Trata-se de um estudo de uma coorte populacional, retrospectivo, relativo às frequências de diferentes alelos identificados por Polimorfismos de Base Única (SNPs) e medidas de associação com sepse neonatal.

Foram incluídos no estudo pacientes que tiveram internação em UTI Pediátrica (UPG), coletaram amostra de DNA para genotipagem para os SNPs *TNF-308* ; *TNF* -

863 ; IL 6-174; LTA+252 ; MIF-173; IL 10- 819 durante tal internação e nasceram na maternidade do Instituto Fernandes Figueira, como representado no gráfico a seguir.

Gráfico 4 – Desenho de Estudo da Pesquisa



Como este estudo tem por finalidade calcular as medidas de associações entre o desfecho sepse neonatal e alelos identificados por SNPs nos pacientes que evoluíram de forma grave em UTI Pediátrica, o período de investigação correspondeu à internação em UTI Neonatal.

Os dados genotípicos disponíveis foram correlacionados com características demográficas e clínicas dos pacientes durante a internação no período neonatal, seja no Berçário de Alto Risco no Departamento de Neonatologia ou na UTI Neocirúrgica no Departamento de Cirurgia Pediátrica do Instituto Fernandes Figueira.

O objetivo do estudo é determinar a frequência e o perfil da sepse neonatal para as crianças com diferentes alelos de citocinas, associando-se os principais fatores de risco de morbidade no período neonatal, frente à amostra selecionada e condições específicas expostas no estudo.

A seleção desses pacientes ocorreu pelo único critério de disponibilidade dos resultados da genotipagem de DNA, realizado e anteriormente em outro estudo e fornecido pela responsável pela linha de pesquisa Dra Zina Maria Almeida de Azevedo.

Após definição dos pacientes selecionados, foi realizada a construção de um banco de dados clínicos, em tabela no Microsoft Excel para MAC versão 2011, com informações coletadas através de consulta aos prontuários durante a internação no período neonatal. Coleta dos dados segundo a ficha elaborada pelo pesquisador da tese (Apêndice 1).

### **5.3.3 Classificação Demográfica dos Pacientes incluídos no Estudo**

As crianças foram classificadas conforme gênero e idade. A idade foi analisada de acordo com a idade gestacional detectada pelo exame físico, de maturidade física e neuromuscular pela exame de *Ballard* (Anexo 1) e considerada a variável em dias de vida.

### **5.3.4 Classificação Clínica dos Pacientes**

Os pacientes foram estratificados quanto a presença ou ausência do diagnóstico de sepse neonatal, segundo informação contida no prontuário. Foram classificados como sepse neonatal aqueles que evoluíram com sepse, suspeita ou confirmada por hemocultura, ou por positividade em líquido, urinocultura, aspirado traqueal, ou swabs positivos e tipificados para germes contaminantes. Os pacientes que apresentaram sepse classificada como precoce ou tardia, ou ambas, foram considerados no mesmo grupo, sem diferenciação quanto ao tempo de vida no momento do diagnóstico da sepse neonatal.

### 5.3.5 Variáveis analisadas

Foram avaliadas variáveis clínicas e demográficas, a partir de prontuários médicos e indexados resultados de amostragem de DNA para polimorfismos genotípicos de citocinas selecionadas.

Foi feito um *script* com as variáveis:

1. Gênero (*Masculino e Feminino*)
2. Idade Gestacional (em dias) pelo *Ballard*
3. Mal formação fetal
4. Peso de nascimento (em gramas)
5. Uso materno de Antibióticos durante o parto
6. Uso materno de corticóide antes do parto
7. Colonização por GBS (*Streptococcus* Beta hemolítico)
8. Parto Cesariana
9. Prematuridade
10. Etnia / Raça
11. Infecção materna por Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus, Hepatites ou Sífilis (TORCHS)
12. Presença de bolsa amniótica rota no momento do Parto
13. Diagnóstico de Sepsis Neonatal
14. Uso de cateter venoso profundo
15. Paciente cirúrgico (CIPE)
16. Assistência ventilatória invasiva

## 5.5 Análise estatística

Todos os dados foram coletados em formulário padronizado e transferidos ao banco de dados desenvolvido para o projeto. Para análise estatística do banco de dados clínicos, foi utilizado o Software R version 2.11.1. A planilha foi gerada pelo Excell e formatada com dados e gráficos gerados a partir desta em formato .csv.

Foram calculadas as frequências genotípicas, alélicas e haplotípicas, em todos os pacientes, dos seguintes *SNPs* ( Polimorfismos de base Única) :

***TNF-308 ; TNF -863 ; IL 6-174; LTA+252 ; MIF-173; IL 10- 819***

Foi utilizado como referência a análise estatística para os alelos das citocinas, baseados em sua maior frequência em populações e estudos descritos na literatura.

Para analisar se as frequências genotípicas estabelecidas correspondem às esperadas pela Lei de Hardy-Weinberg e realizado o Teste  $\chi^2$  no grupo de bebês não sépticos (considerados nosso grupo controle), sendo consideradas em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) as populações que apresentaram resultados abaixo de **3,84**.

Variáveis quantitativas foram apresentadas como médias aritméticas, erro padrão da média e medianas. O Teste T foi utilizado para analisar as diferenças nas variáveis demográficas categóricas (idade gestacional e peso de nascimento). O teste de Chi-Quadrado ou  $\chi^2$  para as variáveis gênero e maturidade (a termo e pré-termo) e entre os pacientes e entre as variáveis clínicas categóricas (uso materno de antibióticos durante o parto, uso materno de corticóide antes do parto, colonização por GBS, parto cesariana, prematuridade, diagnóstico de sepse neonatal, uso de cateter venoso profundo, paciente cirúrgico, assistência ventilatória invasiva, tempo de internação na UTI Neonatal, diagnóstico de sepse na UPG, óbito após período neonatal).

Para correção da variável prematuridade, foi criado um banco somente de prematuros e um só de bebês a termo, para análise separadamente.

Foram realizadas análises estatísticas contemplando genótipos, carreadores, alelos e haplótipos. A Razão de Chances (OR - *Odds Ratio*), com Intervalos de Confiança de 95% (95% IC), obtida através dos modelos de regressão logística GLM e LRM (do inglês “*generalized linear model*” e “*logistic regression model*”), controlando os potenciais fatores de confundimento: prematuridade, gênero, etnia e presença de acesso venoso profundo. Foi realizada uma análise de regressão stepwise assim como testes de interação para avaliar o significado estatístico das co-variáveis etnia, gênero, idade gestacional, peso de nascimento, prematuridade, presença de bolsa rota há mais de 24h, presença de mal formação fetal, parto cesariana e presença de acesso venoso profundo. Dentre estas, a prematuridade, idade gestacional, presença de acesso venoso, uso de ventilação mecânica e nutrição parenteral se mostraram significativas. Foram então mantidas para ajustar o modelo como co-variáveis: prematuridade, presença de acesso venoso profundo, uso de ventilação mecânica e nutrição parenteral. Apesar de não terem sido significativas nos testes de interação, as co-variáveis etnia e gênero foram mantidas no modelo devido a importância que apresentam nos estudos genéticos.

As frequências haplotípicas foram estimadas através do método de Máxima Verossimilhança e comparadas através do mesmo modelo de regressão logística conduzidos para cada SNP isoladamente.

A presença de um desequilíbrio de ligação foi avaliada pelo método estatístico  $R^2$ , utilizando frequências genotípicas dos pacientes e crianças saudáveis.

Foram considerados estatisticamente significativos resultados com P-valor  $< 0.05$ .

Todos as análises genéticas foram realizadas utilizando o programa estatístico R Software R version 2.11.1 (2010-05-31) Copyright (C) 2010. *The R Foundation for Statistical Computing*. ISBN 3-900051-07-0. com os pacotes “*genetics*” e “*Design*” (Design library by *Frank E Harrell Jr.*), com a colaboração da equipe do Laboratório de Fisiopatologia Humana IFF/Fiocruz.

### 5.5 - Análise pelo Comitê de Ética

Este estudo é um desdobramento do projeto principal anteriormente descrito, intitulado: “*Validação de protocolos clínicos para evidenciar marcadores prognósticos para rede de assistência ao paciente pediátrico crítico*” que foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do IFF/Fiocruz sob registro CAAE 0032.0.008.000-09 e aprovado.

O Termo de Consentimento para o acesso e análise do banco de dados acima mencionado, foi devidamente assinado por Dra. Zina Maria Almeida de Azevedo, responsável pelo projeto. Foi informado ao Comitê de Ética do IFF que o projeto de pesquisa atual é considerado um recorte de uma faixa etária pediátrica específica denominada Neonatologia e os resultados obtidos serão aditivos à linha de Pesquisa já registrada.

Da mesma forma, foi obtido e assinado o Termo de Consentimento por Dr João Henrique Leme, Chefe do Departamento de Neonatologia para consulta e análise dos prontuários médicos, assim como o acesso ao banco de dados sistema IFF do período neonatal dos pacientes selecionados na amostra da pesquisa.

O atual projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos CEPIFF/ FIOCRUZ, registrado no CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e, obteve o Registro CAAE 00720008000-11, N<sup>o</sup> da Folha de Rosto: 463823; Registro no CEP 0072/11. E previamente reconhecido pelo Comitê que tratando-se de uma pesquisa que utilizou banco de dados e dados de prontuários, portanto, sem recrutamento voluntário do sujeito da pesquisa e que os documentos foram apresentados, não houve a necessidade da realização de Termos de Consentimento Informado individual.

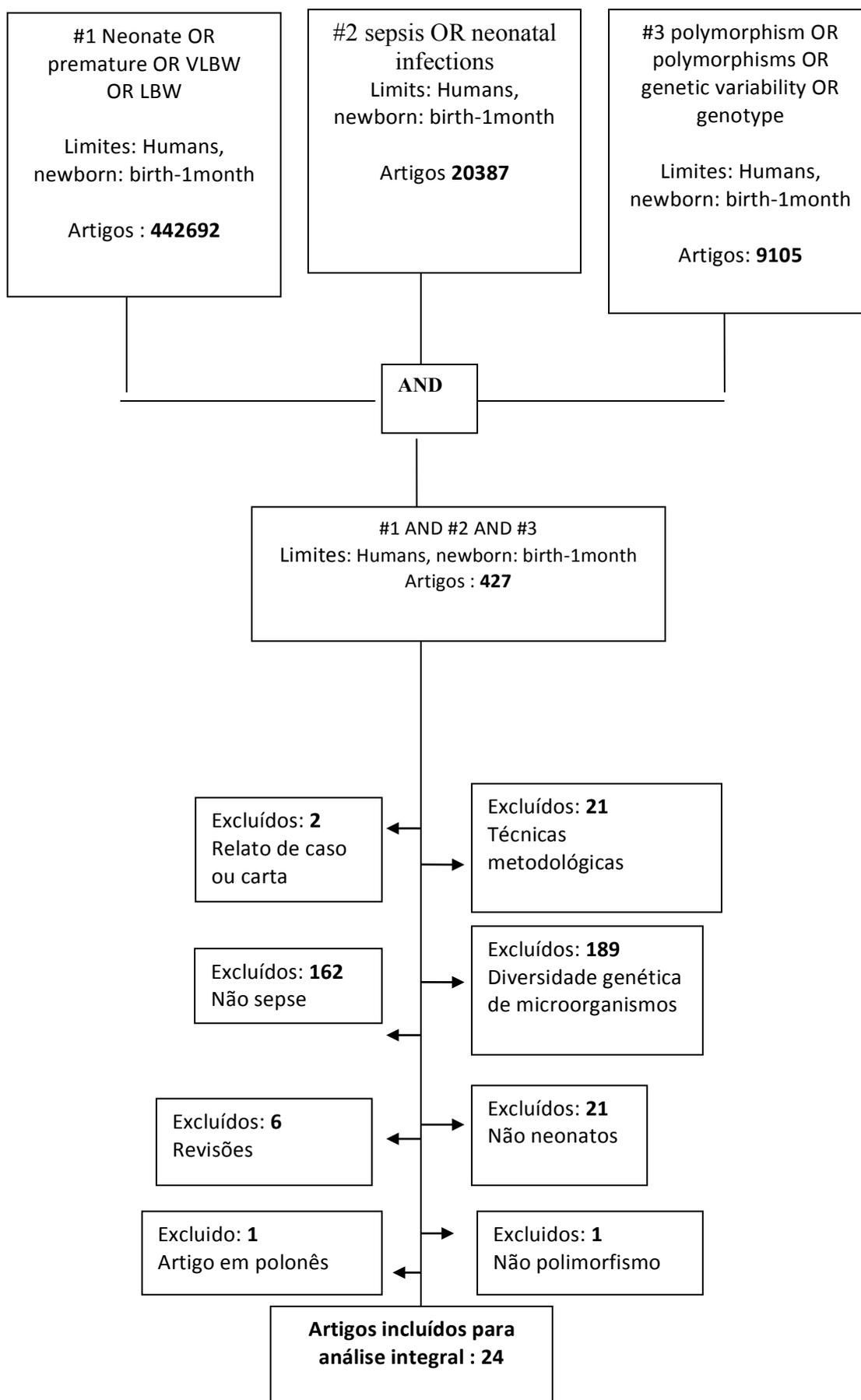
## RESULTADOS

### 6.1 - Revisão sistemática da literatura

Um total de 427 publicações foram analisadas, com base nos títulos e resumos. Após análise do conteúdo, foram excluídos: 1 estudo porque tratava-se de um relato de caso; 1 estudo porque tratava-se de um comentário de outro artigo; 21 artigos por técnicas metodológicas; 189 por serem sobre diversidade genética de microorganismos; 162 por não analisarem sepse como desfecho; 21 por estarem fora da faixa neonatal; 6 revisões sistemáticas; 1 por não analisar polimorfismo e 1 excluídos pelo idioma (em polonês). Os restantes 24 artigos foram analisados em revisão integral, como demonstra o Fluxograma de Busca (Figura 5) e as referências podem ser visualizadas na Tabela 4.

A resenha desses segue uma ordem de SNPs analisados. Contudo, alguns autores analisaram mais de um polimorfismo genético (em alguns casos, muitos). No entanto, as informações serão apresentadas a seguir seguindo uma ordem que respeita o seu grau de importância estatística e epidemiológica, assim como a atenção que o tema de cada artigo já recebeu na literatura (Tabela 5).

Figura 5 - Fluxograma de Busca



**Tabela 4 – Estudos selecionados para análise integral dos dados**

PMID	Título	Ano	Autores
21142772	Mannose-binding lectin codon 54 gene polymorphism in relation to risk of nosocomial invasive fungal infection in PMT neonates in the NICU.	2011	Aydemir <i>et al.</i> <sup>182</sup>
21317641	Tumor necrosis factor- $\alpha$ promoter -308 G/A polymorphism and susceptibility to sepsis in very-low-birth-weight infants	2011	Härtel <i>et al.</i> <sup>92</sup>
20732365	Role of mannose-binding lectin in nosocomial sepsis in critically ill neonates.	2010	Auriti <i>et al.</i> <sup>199</sup>
20463618	Role of polymorphic variants as genetic modulators of infection in neonatal sepsis.	2010	Maziad <i>et al.</i> <sup>183</sup>
20453525	Mannose-binding lectin gene polymorphism and early neonatal outcome in preterm infants.	2010	Koroglu <i>et al.</i> <sup>184</sup>
19571582	Polymorphisms in the Renin-Angiotensin system and outcome of VLBW infants.	2010	Spiegler <i>et al.</i> <sup>185</sup>
18595687	Association between birth weight in preterm neonates and the BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene.	2008	Bertalan <i>et al.</i> <sup>86</sup>
18571528	Interleukin-6 polymorphism is associated with chorioamnionitis and neonatal infections in preterm infants.	2008	Reiman <i>et al.</i> <sup>87</sup>
18317236	The role of mannose-binding lectin in susceptibility to infection in preterm neonates.	2008	Dzwonek <i>et al.</i> <sup>188</sup>
18031556	Mannose-binding lectin genotype in relation to risk of nosocomial infection in PMT neonates in the NICU Infect.	2008	van der Zwet <i>et al.</i> <sup>189</sup>
17108674	Prevalence of two tumor necrosis factor gene polymorphisms in premature infants with early onset sepsis.	2006	Schüller <i>et al.</i> <sup>87</sup>
16982492	Selectin polymorphisms and perinatal morbidity in low-birth weight infants.	2006	Derzbach <i>et al.</i> <sup>190</sup>
16882823	Genetic polymorphisms of hemostasis genes and primary outcome of VLBW infants.	2006	Härtel <i>et al.</i> <sup>191</sup>
16611358	IL-10, IL-6 and CD14 polymorphisms and sepsis outcome in ventilated VLBW infants.	2006	Baier <i>et al.</i> <sup>192</sup>
16444434	Effect of various genetic polymorphisms on the incidence and outcome of severe sepsis.	2006	Sipahi <i>et al.</i> <sup>90</sup>
16385250	Genetic polymorphisms of CD14, toll-like receptor 4, and caspase-recruitment domain 15 are not associated with NEC in VLBW infants.	2006	Szebeni <i>et al.</i> <sup>193</sup>
16208404	Interleukin-6-174-genotype, sepsis and cerebral injury in VLBW infants.	2006	Göpel <i>et al.</i> <sup>194</sup>
15549142	Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism does not alter sepsis outcome in ventilated VLBW infants.	2005	Baier <i>et al.</i> <sup>195</sup>
15131465	TNF alpha -308 polymorphism associated with increased sepsis mortality in VLBW.	2004	Hedberg <i>et al.</i> <sup>85</sup>
14739370	Mutations of genes involved in the innate immune system as predictors of sepsis in VLBW.	2004	Ahrens <i>et al.</i> <sup>196</sup>
14673228	Association between IL-1ra gene polymorphism and premature delivery.	2004	Bessler <i>et al.</i> <sup>197</sup>
14523169	Is interleukin-6 -174 genotype associated with the development of septicemia in preterm infants?	2003	Harding <i>et al.</i> <sup>110</sup>
12743452	Genetic variants of TNF-[FC12]a, IL-1beta, IL-4 receptor [FC12]a-chain, IL-6 and IL-10 genes are not risk factors for sepsis in LBW infants.	2003	Trezn <i>et al.</i> <sup>199</sup>
10782394	Pilot study assessing TNF gene polymorphism as a prognostic marker for disease progression in neonates with sepsis.	2000	Weitkamp <i>et al.</i> <sup>86</sup>

Tabela 5 - Estudos de associação entre diversos SNPs e sepse neonatal

Autor	Ano	País	Pacientes	Coorte	Etnia	SNPs	Casos/Controles	Desfechos	Achados
Weitkamp	2000	Alemanha	neonato	prospectiva	SR*	TNF B1 e TNF B2	n = 46	sepse	sem associação significativa
Harding	2003	Inglaterra	PMT	prospectiva	caucasiana	// 6-174	n = 157	sepse	Aumento significativo sepse bacteriana confirmada IL6—174 GG
Treszl	2003	Hungria	EBP	retrospectiva	SR*	TNF-308, // 1β, IL 4R, IL 6-174 e IL10-1082	n=78 /n= 35	sepse	sem associação significativa
Bessler	2004	Israel	PMT	prospectiva	mista	// 1-ra	n = 95 / n=61	sepse	sem associação significativa
Ahrens	2004	Alemanha	EBP	prospectiva	caucasiana	CD 14-159, TLR 4-896, // 6-174, MBL B,C,D	n= 356 / n= 306	sepse	IL-6-174-GG e NOD-2-302ins C maior proporção sepse comprovada
Hedberg	2004	EUA	EBP	retrospectiva	mista	TNF-308	n=173	sepse	maior mortalidade na presença de AA/AC na bacteremia
Baier	2005	Canada	EBP	retrospectiva	mista	ACE D, I	n=23/ n= 72	sepse	sem associação entre ACE SNP e desfecho de sepse
Baier	2006	Canada	EBP	retrospectiva	mista	// 6-174, // 10-1082, CD 14-260	n=293/ n=264	sepse	incidência maior de sepse tardia IL-10 - 1082A e IL-6 -174C
Derzbach	2006	Hungria	BP	retrospectiva	SR*	Selectinas E, P,L	n=125/n=156	SR	carreadores de L-selectina 213Ser: maior risco PMT e BPD.
Schueller	2006	Alemanha	PMT	retrospectiva	SR*	TNF-308 e TNF β Ncol	n=67/ n=102	sepse	sem associação entre os dois alelos de TN e sepse
Sipahi	2006	Turquia	crianças	prospectiva	SR*	TNF- 308, // 6-174, PAI-1, PVL, EPCR, CTSG	n=53/ n=77	óbito	TNF-α 308 G/A, PAI-1 4G/4G, e EPCR influenciam o risco de sepse severa
Gopel	2006	Alemanha	BP	prospectiva	mista	// 6-174	n= 421	sepse e HIC	sem associações
Szebeni	2006	Hungria	EBP	prospectiva	SR*	CD 14-159, TLR 4-896, CARD 15	n=118/ n=146	NEC	sem associações
Hartel	2006	Alemanha	EBP	prospectiva	caucasiana	Val34Leu do fator XIII Protrobina G20210A Fator VII 323 del/ins	n= 785	sepse	sem associações
Van der Zweet	2008	Holanda	PMT	retrospectiva	SR*	MBL B,C,D	n=186	sepse	não achou correlações
Dzewonek	2008	Inglaterra Polónia	PMT	prospectiva	SR*	MBL B,C,D	n = 166	sepse	MBL e risco de sepse
Bertalan	2008	Hungria	PMT	retrospectiva	SR*	Bc II	n = 125 /n= 68	sepse	sem associações
Reiman	2008	Finlândia	EBP	prospectiva	SR*	// 6-174	n=107	sepse	correlação entre o alelo CC e prevalência de sepse em PMT
Koroglu	2010	Turquia	PMT	prospectiva	SR*	MBL B,C,D	n= 99	sepse	aumento significativo sepse, PCA
Auriti	2010	Itália	neonato	prospectiva	SR*	MBL B,C,D	n= 127 /n= 85	óbito	nenhuma associação foi encontrada
Spiegler	2010	Alemanha	EBP	prospectiva	SR*	ACE D, I	n =1209/ n=1168	sepse	nenhuma associação foi encontrada
Maziad	2010	EUA	PMT	retrospectiva	mista	**	n=333/ n=202	sepse	TLR2 ,TLR5 ,IL10 e PLA2G2A com sepse. PLA2G2A e TLR2 G+. e IL10 G-
Aydemir	2011	Turquia	PMT	prospectiva	SR*	MBL B,C,D	n=31/ n=30	sepse	nenhuma associação foi encontrada entre SNP e sepse fúngica invasiva
Hartel	2011	Alemanha	EBP	prospectiva	mista	TNF-308	n=2970	sepse	nenhuma associação foi encontrada

Legenda: SR\* : sem relato ; EBP: Extremo Baixo peso ao nascer; PMT: Prematuros

### 6.1.1 Polimorfismo do Fator de Necrose Tumoral -308

**Weitkamp et al. 2000<sup>86</sup>**

Esse artigo relata o impacto do polimorfismo de TNFB1 e TNFB2 na sepse neonatal, usando uma pequena amostra (23) de prematuros e neonatos a termo com sepse confirmada por cultura, para avaliar indicadores clínicos e laboratoriais na progressão da doença. O foco é na comparação do homozigoto (B2B2) *versus* subgrupos heterozigoto (B1B2) e homozigotos B1B1. As crianças foram predominantemente prematuras e de muito baixo peso ao nascer. Nem o peso nem a idade gestacional variaram significativamente entre os 2 grupos homozigotos. Um número de critérios laboratoriais foram avaliados (níveis máximos PCR; número de dias com PCR elevado; a relação entre neutrófilos maduros e imaturos; total de dias de uso de antibióticos). **Nenhum deles forneceu informação relevante.** A mortalidade observada foi associada a condições preexistentes e considerada multifatorial. No geral, a avaliação deste polimorfismo específico não forneceu nenhuma informação relevante. Da mesma forma, as avaliações neurológica, farmacológica, gastrointestinal não representaram uma melhora. Os pontos positivos foram: a) sepse rigorosamente definida; b) abordagem direta, comparação da frequência genotípica em pacientes com sepse comprovada contra subgrupos definidos por parâmetros clínicos laboratoriais. Limitações e falhas foram: a) ausência de um grupo

controle; b) as comparações foram feitas somente com pacientes adultos apresentando sepse severa; c) amostra muito pequena; d) os critérios laboratoriais avaliados foram em sua maioria arbitrários, ou dependentes de muitas variáveis não controladas o tempo da dosagem de PCR, suscetibilidade dos patógenos aos antibióticos administrados; a variedade dos próprios antibióticos, que acarretam diferenças farmacocinéticas e farmacodinâmicas entre os pacientes. Principalmente, nenhuma evidência de que o polimorfismo afeta a produção de citocinas, como sugerido no embasamento do estudo, foi fornecido pelo mesmo.

#### **Trezi et al 2003<sup>197</sup>**

Esse artigo aborda a influência do polimorfismo nos genes para TNF- $\alpha$  (-308), IL-1 $\beta$  (não IL-1Ra), IL-4R $\alpha$ , IL-6 e IL-10 na sepse em bebês de baixo peso ao nascer. Seu enfoque é clássico: genotipagem na sepse e grupo controle foram acompanhados pela comparação do alelo e da frequência genotípica nesses grupos. Um pequeno efeito de haplótipos foi observado quando variantes de IL-1 $\beta$  e IL-10 foram combinados, no caso específico de CIVD. Esses alelos e haplótipos foram estudados com a possibilidade de influenciar a produção e níveis de IL-1 $\beta$  e IL-6, entretanto não está claro como o “nível” foi definido apropriadamente. O esforço foi feito porque “níveis” de citocinas mostraram ter valor prognóstico na sepse (mesmo que o “nível” não seja determinado pela expressão de um dado alelo, e mesmo que interações entre alelos, genes e fatores não-genéticos provavelmente desempenham papéis importantes na intensidade da resposta). Os pontos

fortes : a) um painel amplo de genes candidatos e b) uma hipótese bem testada; c) critérios bem delimitados para sepse e infecção, com uma alta proporção de sepse comprovada microbiologicamente. **As conclusões não mostram um ganho significativo no poder prognóstico pela tipagem de um ou múltiplos genes.** Outros aspectos positivos: vários aspectos complexos foram abordados e discutidos: a) a incapacidade de observar culturas positivas, mesmo no caso de sepse, foi parcialmente atribuída a um uso prévio de antibióticos; b) mesmo crianças livres de infecção apresentaram falência múltipla de órgãos; c) PCR e CIVD foram melhores indicadores de sepse do que os outros marcadores. Deficiências do estudo: a) o tamanho da amostra é pequena (33 sépticos/35 infectados/35 crianças saudáveis com baixo peso ao nascer) ; b) as deficiências metodológicas no projeto foram múltiplas. É óbvio que a produção de citocinas depende de genes funcionantes, e que condições padronizadas poderiam refletir o potencial funcional de genótipos específicos. Isto não acarreta, entretanto, que as condições *in vivo* nos pacientes com sepse sejam comparáveis àquelas encontradas em protocolos padronizados. A produção de citocinas é dinâmica, variável entre indivíduos normais e altamente dependente do momento e da força do estímulo. Uma outra falha é a expressão da unidade de leucócitos errada (g/L).

**Hedberg et al 2004** <sup>84</sup>

Esse artigo avaliou o mesmo SNP *TNF-308* e concluiu que este não afeta o desenvolvimento da sepse em bebês submetidos à ventilação mecânica, mas pode

influenciar a mortalidade quando esse paciente se torna séptico, através de um mecanismo não caracterizado. A abordagem foi realizar genotipagem e avaliação clínica (retrospectiva) dos casos definidos de diferentes formas (sepse, sepse precoce, sepse tardia, bacteremia/fungemia, colonização do tubo orotraqueal, e mortalidade por sepse). Para todos os desfechos clínicos, os dois grupos comparados foram homozigotos GG e homozigotos/heterozigotos A. Para todos os desfechos, exceto mortalidade para sepse, proporções comparáveis de casos foram achadas nos dois grupos. Vale ressaltar que, esse estudo foi precedido por dois estudos menores, que não conseguiram mostrar um risco aumentado de sepse nos portadores da variante -308. O mais recente estudo também não conseguiu mostrar um aumento do risco de sepse por si só, entretanto, sugere que há um risco aumentado de mortalidade por sepse. Pontos positivos incluíram: a) boa caracterização da sepse precoce *versus* sepse tardia, através de colonização de tubo endotraqueal e cultura de sangue; b) alguma atenção à etnia (caucasianos *versus* afro-americanos); c) o cuidado em avaliar as taxas de infecção até em crianças não sépticas. A referência que esse SNP é conhecido pela influência na produção de TNF de uma forma que altos produtores são mais suscetíveis à sepse (independente se essa informação é válida para adultos, ou crianças mais velhas, no contexto da sepse neonatal isso não é sustentado por um grande estudo de corte realizado por Härtel e colaboradores).

Esse artigo examina a influência de 2 SNPs da região do TNF previamente caracterizados (TNF- $\alpha$  -308; TNF- $\beta$  *NcoI*) sobre a sepse tardia em prematuros (<32 semanas). Amostras de sangue em papel filtro foram avaliadas a fim de comparar 67 prematuros com sepse precoce com 102 neonatos saudáveis (>32 semanas). O estudo também incluiu um grupo controle adulto. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado. **O artigo desaconselha o uso de qualquer um dos marcadores para o prognóstico da sepse neonatal.** Pontos fortes incluem: a) teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg; b) critérios adequados para sepse, tanto microbiologicamente comprovados ou não (sepse clínica/ sepse suspeita); c) uma amostra três vezes maior que o estudo piloto de Weitkamp et al., que ainda assim não conseguiu melhorar os dados negativos daquele estudo. Limitações: a) etnia não foi avaliada; b) nomenclatura confusa (uso indiscriminado de TNF- $\beta$  e Linfotoxina- $\alpha$  no mesmo texto); c) conceitos confusos (“polimorfismo bialélico do polimorfismo NCoI ”; “gene genótipo”, etc.). O mais importante é que os mesmos autores mostraram em outro artigo que o polimorfismo TNF- $\beta$  pode influenciar o risco de hemorragia intraventricular.

#### **Sipahi et al 2006 <sup>89</sup>**

Esse artigo avaliou o impacto de alguns polimorfismos no risco de sepse e sepse severa em **pacientes pediátricos**. A referida amostra do grupo **não foi restrita à idade neonatal**. O **número de neonatos incluídos no estudo não foi especificado**, e nem os dados clínicos ou à idade foram descritos. Apesar dos resultados do estudo sugerirem um

efeito do polimorfismo -308 TNF, é possível que isto ocorra em crianças maiores, e não em neonatos. Eles se concentraram nos fatores regulatórios de coagulação (PAI, EPCR) e catepsina, que participam do processo de coagulação e reações inflamatórias em condições específicas. Vale ressaltar que a coorte desse estudo foi consideravelmente pequena.

#### **Härtel et al, 2011<sup>91</sup>**

Este estudo genético de associação testou somente o polimorfismo -308 TNF- $\alpha$  em duas grandes e coortes diferentes de RN de muito baixo peso ao nascer, distinguindo entre sepse tardia e sepse (confirmada com cultura). Com 1944 RNMBP ao nascer os recém-nascidos em 14 centros de estudo (2003 a 2008) e 976 mães, e um Segundo coorte prospectivo de 926 RNMBP em 2009 (Rede Neonatal alemã).

Resultados: Em coorte I, 344 de 1944 (18,2%) RN MBPN tiveram pelo menos um episódio de sepse comprovada. A incidência da sepse estratificada ao genótipo foi de 19,3% para G/G, de 15,8% para G/A, 10,0% para A/A genótipo (Cochrane-Armitage teste de tendência: G/G vs G/A: razão de chances, 1,32, intervalo de confiança de 95%, 1,03-1,71; G/G vs A/A: razão de chances, 1,74; intervalo de confiança 95%, 1,06 -2,91; < 0,03).

Houve uma tendência para a associação TNF 308 - A/G com sepse tardia (incidência: 17,2% para G/G, 12,5% para G/A, 10,0% para A/A; Cochrane-Armitage tendência teste: G/G vs G/A: odds ratio, 1,43; intervalo de confiança 95%, 1,09 - 1,9; G/G vs A/A: odds ratio, 2,05; intervalo de confiança 95%, 1,19 -3,56; p< 0,009).

Duas associações foram inicialmente sugeridas, uma com sepse e outra com sepse tardia.

**Nenhuma das duas resistiu a correções para comparações múltiplas.** Este estudo, diferentemente de publicações anteriores na área, avaliou diretamente o impacto

funcional deste polimorfismo nas respostas de citocinas *ex vivo*, usando tanto bactérias vivas quanto lipopolissacarídeo como estímulo. Aspectos positivos: a) a maior coorte combinada já usada para examinar estes assuntos em crianças; b) genotipagem corroborada por estudos funcionais; c) critérios estritos para sepse (comprovação microbiológica); d) confirmação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW); As limitações são: a) não determinação de etnia; b) informações microbiológicas limitadas. As conclusões são sólidas. Apesar de recente meta-realizada por Teuffel et al<sup>90</sup> (2009) ter demonstrado que um alelo TNF 308 está associado com maior risco de sepse em coortes de adultos, as conclusões desse estudo não apoiam o uso deste polimorfismo como marcador prognóstico para prematuridade ou para a sepse precoce. Assim, as diferenças entre adultos e crianças precisam ser incorporados em projetos futuros com estudos para avaliação de risco para sepse nestes perfis.

Vale notar que os mesmos autores relataram uma associação entre polimorfismo do TNF- $\alpha$  e hemorragia intraventricular.

### **6.1.2 Polimorfismo da Interleucina-6**

#### **Harding et al 2003<sup>109</sup>**

Este artigo avaliou o impacto de polimorfismos da IL-6 em septicemia comprovada bacteriologicamente em bebês prematuros. É importante o fato da septicemia ter sido classificada em tardia ou precoce, sendo que casos “suspeitos” de septicemia não foram incluídos. Tiveram cuidado para eliminar o viés devido a gêmeos ou vários irmãos, e para documentar que as frequências genótípicas foram similares às encontradas em

adultos da mesma população, não foram afetadas por etnia, e seguiram EHW. **Um impacto significativo foi documentado em uma coorte de tamanho pequeno a médio.**

Os pontos fortes incluem: a) critérios de septicemia muito estritos (que podem ter contribuído para o forte efeito observado); b) avaliação de etnia e do EHW; c) correção para viés de múltiplos irmãos. As Limitações são essencialmente devidas ao pequeno tamanho da coorte.

**Ahrens et al., 2004** <sup>195</sup>

Este estudo realizado na Alemanha com 356 recém nascidos de muito baixo peso (VLBW) caucasianos. Destes 306 não apresentaram sepse e 50 apresentaram sepse (sepse foi determinado como a presença de hemocultura positiva).

As genotipagens foram feitas pela metodologia de PCR convencional pelo método RFLP. Os SNPS avaliados foram: SNP CD14-159, TLR4-896, IL6-174, e MBL B/C/D genótipos, NOD2-3020insC. Resultados: mostrou que o genótipo GG para o SNP IL6-174 foi associado a risco para presença de hemocultura positiva (OR=1,9 ;p=0.03). o aumento na taxa de sepse entre os homozigotos GG para o SNP IL6-174 estava especialmente relacionado a um aumento de infecções por germes gram-positivos e não foi visto em pacientes que receberam profilaxia com teicoplanina (frequência de sepse por gram positivo em recém natos GG para o SNP IL6-174 sem profilaxia 16,5% versus 2,4% em recém natos que receberam profilaxia).

**Baier et al., 2006**

Neste estudo, complicações infecciosas foram determinadas, retrospectivamente, em 293 RNMBP (<1500 g ao nascer; 233 afro-americanos, 57 brancos e 3 latino-americanos) em ventilação mecânica, que foram genotipados para os SNP IL-6 -174

G/C, IL-10 -1082 G/A e CD14 -260 C/T . O DNA genômico utilizado para este estudo caso-controle foi extraído de centrifugado de secreção traqueal (AT), ou de sangue, coletados prospectivamente, como parte de um estudo em curso de fatores genéticos no desenvolvimento de complicações da prematuridade. **O alelo IL-6-174-C foi associado a um aumento da incidência de sepse em pacientes afro-americanos, mas não caucasianos.** Em lactentes afro-americanos portadores do alelo C, a incidência de sepse tardia foi significativamente mais alta que em recém-nascidos homocigotos GG. **O alelo IL-10 -1082-A foi associado com um aumento da incidência de sepse tardia.** Vários episódios de sepse foram encontradas no grupo de genótipo TT, refletindo um forte efeito do genótipo TT na incidência de múltiplos ICS em lactentes afro-americanos. **Os autores concluem que os SNP IL-6 -174 G / C, a IL-10 -1082 G/A e CD14-260 C/T podem alterar o risco para infecção em RNMBP ventilados.** Limitação: Porque apenas as crianças que estavam sob ventilação mecânica foram incluídos, o verdadeiro impacto dos polimorfismos estudados sobre a incidência de complicações infecciosas da prematuridade pode ser subestimada.

**Göpel et al 2006** <sup>193</sup>

Este artigo abordou o impacto dos polimorfismos da IL-6 na sepse e desfechos relacionados em uma grande coorte de bebês. Os desfechos investigados foram: leucomalacia; hemorragia intraventricular de níveis III-IV; e morte. **Nem a sepse, nem os outros desfechos estiveram associados com este polimorfismo, contradizendo trabalhos anteriores, deste e de outros grupos, todos com coortes relativamente pequenas.** Os pontos fortes incluíram: a) coorte grande; b) caracterização microbiológica cuidadosa de infecções sanguíneas e colonização; c) critérios estritos para sepse. Um

aspecto positivo adicional foi a comparação com estudos anteriores sobre o mesmo assunto.

#### **Reiman et al 2008 <sup>186</sup>**

Este artigo avaliou o impacto de polimorfismos da IL-6 em corioamnionite e infecções neonatais. Eles mencionam um grande número de estudos anteriores (não necessariamente cobertos em nossa busca) com resultados um pouco contraditórios nesses tópicos, e prosseguem para analisar a associação entre dois diferentes polimorfismos da IL-6 com sepse e condições clínicas relacionadas, como: corioaminionite; enterocolite necrosante; doença pulmonar crônica. **Apesar da maior parte do estudo ter se concentrado nessas condições, um efeito significativo também foi observado na septicemia.** Como em outros estudos, a septicemia foi definida pela cultura microbiológica e a identificação de micróbios na circulação. Os pontos positivos são: a) ênfase na septicemia comprovada microbiologicamente (o que pode ter desempenhado papel no forte efeito observado); As limitações foram principalmente devidas ao pequeno tamanho da coorte.

#### **6.1.3 Polimorfismo no Gene do IL-1ra**

#### **Bessler et al 2004 <sup>196</sup>**

Este artigo documenta um impacto do polimorfismo do gene do IL-1Ra no parto prematuro. Este mesmo estudo **não consegue documentar um impacto no início precoce da sepse**. Em adultos, o IL-1Ra é importante para o desfecho clínico da sepse. Sua biologia é complexa, porque a região envolvida está sujeita a repetições aleatórias de uma sequência relativamente longa, e o sistema genético gerado inclui 6 alelos diferentes com comprimentos bem diferentes. Os alelos influenciam a transcrição tanto de IL-1Ra quanto de IL-1 $\beta$  (não necessariamente em direções opostas, mas possivelmente com eficiências diferentes). Os pontos fortes incluem: a) etnia definida com clareza; b) idade gestacional cuidadosamente determinada; c) uma pequena diferença na idade gestacional (29/32 semanas) entre bebês pré-termo e a termo, mas que se refletiu em diferenças claras no peso ao nascimento; d) boas definições clínica e microbiológica de sepse; e) incorporação de dados extra de adultos de outro estudo alemão não-relacionado.

#### **6.1.4 Polimorfismo da Lectina Ligadora de Manose (MBL)**

**Van der Zwet et al 2007** <sup>188</sup>

Este artigo abordou o impacto de múltiplas mutações no gene da MBL no parto prematuro e na sepse em bebês. O estudo sugeriu uma associação entre os polimorfismos da MBL e parto prematuro, mas apesar de bebês prematuros apresentarem, como esperado, uma alta prevalência de sepse, **nenhuma associação específica entre**

**polimorfismos da MBL e sepse propriamente dita foi demonstrada.** Eles discutiram, tanto o impacto do genótipo na deficiência de MBL, como a possibilidade do fenótipo (baixos níveis de MBL) ser influenciado de várias formas complexas por este genótipo (com forte interação entre fatores genéticos e não genéticos, além dos próprios genes da MBL). Os pontos fortes incluem: a) grande coorte; b) boa caracterização microbiológica dos casos de sepse

**Dzwonek et al, 2008** <sup>187</sup>

Este artigo examinou genótipos e fenótipos de MBL em crianças inglesas e polonesas. Eles descobriram que, apesar dos genótipos não estarem significativamente associados à sepse, os fenótipos estão. Isto significa que fatores além da variação genética propriamente dita desempenham um papel importante no risco de desenvolver sepse, através do seu efeito na produção de MBL. Os pontos fortes são: a) correlação funcional com estudos genéticos; b) boa avaliação da relação entre nascimento prematuro e baixos níveis de MBL; c) boa caracterização da curva de maturação para produção de MBL; d) boa definição do impacto dos genes na deficiência de MBL. A definição de sepse incluiu tanto a sepse comprovada microbiologicamente quanto sepse suspeita. Outro ponto positivo foi: justificativa para avaliar tanto os genótipos quanto os fenótipos de MBL muito bem estruturada. As limitações foram: a) não houve avaliação de etnia ou EHW.

**Koroglu et al 2010** <sup>183</sup>

Este artigo abordou o impacto dos polimorfismos da MBL na sepse e na sepse precoce em bebês na Turquia de baixo peso ao nascer. É digno de nota que os autores foram capazes de documentar um impacto significativo em dois parâmetros (sepse clínica e scores de *Tollner* para sepse, mas não conseguiram documentar uma associação entre dois outros desfechos, possivelmente mais relevantes, a sepse microbiologicamente comprovada e a mortalidade associada a sepse. Sua coorte teve tamanho relativamente pequeno. O número de polimorfismos avaliados foi pequeno (um único alelo foi examinado), e indivíduos homocigotos portadores do alelo predominante foram comparados tanto com heterocigotos quanto com homocigotos portadores do alelo variante, sem estudos funcionais para validar a suspeita sem que estudos funcionais para validar métodos genotípicos correlacionados com a hipótese que fenótipos são claramente distinguíveis. Segundo os próprios autores, seu estudo aborda um desfecho mais brando que em estudos anteriores, que não acharam uma associação entre polimorfismo da MBL e sepse microbiologicamente comprovada. Mesmo assim, eles foram capazes de apresentar sua associação baseada em um parâmetro mais sensível, visto que a detecção microbiológica tem baixa sensibilidade e não se dá a repetições do ensaio. Os pontos fortes incluem: a) determinação de EHW; b) bons critérios para os vários desfechos clínicos relacionados à prematuridade e muito baixo peso ao nascimento. As limitações estão principalmente relacionadas à escolha da “sepse clínica” como o desfecho relevante, assim como ao pequeno tamanho da coorte. Uma limitação adicional foi o número de polimorfismos avaliados, e a falta de importância dada a etnia.

**Auriti et al, 2010** <sup>198</sup>

Um estudo prospectivo observacional realizado na Itália feito com 365 neonatos em estado crítico, 261 sem infecção e 104 com pelo menos 1 evento séptico, com objetivo de investigar possível associação entre níveis séricos da lecitina ligadora de manose (MBL) e sepse nosocomial (SN), suas alterações durante o curso de infecção, sua relação com patógenos, com o genótipo do MBL2 e sua relação com a mortalidade.

Resultados: A mediana da concentração sérica de MBL foi significativamente menor em neonatos infectados se comparado a não infectados ( $p < 0.001$ ). Baixos níveis de MBL na admissão aumentaram o risco de infecção, independentemente da idade gestacional e da realização de procedimentos invasivos. A mediana do pico de MBL durante a infecção foi maior que a mediana do nível na admissão ( $p < 0.001$ ) e estava correlacionada com a infecção ( $r^2 = 0.83$ ,  $p < 0.001$ ). Além disso, os níveis de MBL na admissão não estavam relacionados com a morte (OR=0.80, 95% CI=0.56–1.14,  $p = 0.21$ ). Da mesma forma, não foi encontrada associação entre a mediana dos níveis máximos durante a infecção e morte entre neonatos infectados (OR=1.10, 95% CI=0.78–1.57,  $p = 0.57$ ). 127 neonatos (42 infectados) foram genotipados para variantes nos éxons -1 e -221 do promotor do gene MBL2, e não foram encontradas diferenças significativas nas frequências dos genótipos entre neonatos infectados e não-infectados.. Além disso, não foi encontrada associação entre os genótipos do MBL2 e morte.

**Aydemir et al., 2010** <sup>181</sup>

Este estudo avaliou o polimorfismo do códon 54 no éxon 1 do gene da MBL em 31 pacientes diagnosticados com sepse fúngica e 30 RN prematuros controles e não encontrou associação entre esse polimorfismo e o desenvolvimento de sepse fúngica. Uma das limitações desse estudo é o número amostral muito pequeno para avaliação

genotípica.

### 6.1.5 Polimorfismo do CD14

**Szebeni et al., 2006** <sup>192</sup>

Este artigo examinou o impacto de polimorfismos nos genes de CD14, TLR4 e CARD15 sobre a incidência de enterocolite necrosante e sepse em bebês com muito baixo peso ao nascimento. Eles não acharam **nenhuma evidência de um impacto destes polimorfismos em qualquer um dos dois desfechos**. No que diz respeito à sepse, seus dados não conseguiram confirmar um estudo anterior de associação do genótipo heterozigoto para CARD15 com suscetibilidade à sepse, mas concordaram com as conclusões de um estudo anterior, que não conseguiu demonstrar um efeito de polimorfismos do gene do TLR4 na sepse infantil. Os pontos fortes incluem: a) teste para EHW; b) demonstração de desequilíbrio de ligação para dois polimorfismos próximos no gene do TLR4; c) amostra de tamanho grande; d) abordagem direta (estudo retrospectivo dos casos definidos como enterocolite necrosante, sepse, broncodisplasia ou hemorragia intracraniana, e controles, definidos pela sua ausência) na coorte de muito baixo peso.

### 6.1.6 Polimorfismo de Selectinas

**Derzbach et al., 2006**<sup>189</sup>

Este artigo avaliou o efeito de polimorfismos dos genes das selectinas E, P e L em 3 desfechos relacionados (parto prematuro, sepse, broncodisplasia). Os autores compararam frequências alélicas e genóticas em 2 grupos de bebês (saudáveis e baixo peso). Subsequentemente, as frequências genotípica e alélica foram determinadas em bebês diferenciados pela presença de sepse ou broncodisplasia. Polimorfismos da selectina E- e P não tiveram efeito detectável. **O polimorfismo da L-selectina teve um impacto no parto prematuro, mas não no desenvolvimento precoce de sepse.** Os pontos fortes são: a) a avaliação de polimorfismos com uma correlação funcional, definida por mudanças na sequência de aminoácidos da proteína; b) diferenciação entre classes de selectinas, de acordo com suas funções; c) testar associações de prematuridade antes de testar desfechos associados à prematuridade (sepse). Uma falha deste artigo foi definir selectinas como proteínas ligadoras de lectinas.

**6.1.7 Polimorfismo da Enzima Conversora de Angiotensina****Baier et al., 2005**<sup>194</sup>

Este artigo avalia o impacto de polimorfismos da ECA em diferentes desfechos infecciosos (desenvolvimento precoce e tardio da sepse, múltiplos episódios de

bacteremia/fungemia, colonização do tubo traqueal, e mortalidade associada por sepse) em bebês de muito baixo peso ao nascer. Os autores compararam casos (subdivididos como acima) e controles para a representação dos alelos D e I, e os vários genótipos da ECA. Os dados genéticos foram comparados a dados de outros estudos para as frequências desses alelos e genótipos em outras populações. **O estudo conclui que, em bebês de muito baixo peso ao nascer, esses polimorfismos não tem impacto em nenhum desses desfechos infecciosos.** Essa situação contrasta com a observada em outras faixas etárias (pacientes idosos, crianças com meningococemia), onde foi documentado um impacto. Os pontos fortes são: a) definição cuidadosa de sepse e de episódios infecciosos; b) caracterização microbiológica dos principais grupos de patógenos envolvidos; c) caracterização dos tubos colonizados e confirmação da relação entre isolados do sangue e do tubo para cada paciente individualmente; d) caracterização adequada da etnia; e) justificativa muito bem articulada para o estudo, com uma retrospectiva das várias linhas de evidência que sugerem um importante papel patofisiológico para a ECA na sepse.

#### **Spiegler et al., 2010**

Spiegler *et al* ampliam e **confirmam observações prévias da falta de impacto de polimorfismos do sistema renina-angiotensina** (tanto a inserção/deleção de alelos no polimorfismo da ECA e polimorfismos do receptor tipo II da angiotensina) em uma grande variedade de desfechos relacionados em bebês de muito baixo peso ao nascer,

incluindo sepse. Os pontos fortes são: a) o grande tamanho da coorte; b) abordagem direta para detectar associações; c) uso de dois genes candidatos independentes associados em uma sequência funcional (ECA e receptor tipo II da angiotensina); c) confirmação do EHW; d) cuidado em minimizar o uso de irmãos na coorte, para minimizar a detecção de associações espúrias; e) atenção adequada a etnia.

### **6.1.8 Polimorfismo da IL-10, PLA2, TLR2, TLR5**

**Abu Maziad et al., 2010.**

Estudo retrospectivo e caso-controle em 535 prematuros com o objetivo de examinar o papel do polimorfismo dos genes que medeiam respostas imune do hospedeiro à infecção bacteriana na recém-nascidos. Um total de 49 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em 19 genes candidatos incluindo citocinas inflamatórias (IL6, IL10, IL1B, TNF), receptores de citocinas (IL1RN), receptores *Toll-like* (TLR2, TLR4, TLR5) e receptores de superfície celular (CD14) foram genotipados. Os indivíduos foram estratificados 3 grupos (sepse, sepse suspeita controle) e os dados foram analisados usando teste de desequilíbrio de transmissão. Resultados: peso ao nascer, idade gestacional, duração do ruptura de membranas, e presença de corioamnionite clínica foram fortemente associados com sepse. Os Polimorfismos em genes TLR2 (rs3804099), TLR5 (rs5744105), IL10 (rs1800896), e PLA2G2A (rs1891320) foram associados com sepse. Variantes alélicas em PLA2G2A e TLR2 foram associados com infecções Gram-positivos, enquanto IL10 foi associado com infecções Gram-negativas ( $p < 0,05$ ). Os autores concluíram variações alélicas em PLA2G2A, TLR2, TLR5 e IL10 podem

moderar a predisposição à sepse em prematuros.

### **6.1.9 Polimorfismo dos Genes que codificam fatores hemostáticos**

#### **Hartel *et al.*, 2006**

Esse estudo alemão prospectivo e retrospectivo, multicêntrico, investigou o impacto de polimorfismos genéticos em genes ligados à hemostase (fator V de Leiden; protrombina G20210A; fator VII-323 del/ins; e fator XIII-Val34Leu) em 586 neonatos de muito baixo peso (prospectivos) e em 595 neonatos de muito baixo peso (retrospectivos) (1181 total) 261 sem infecção e 104 com pelo menos 1 evento séptico, nos parâmetros prognósticos iniciais da sepse, displasia broncopulmonar, hemorragia intraventricular e leucomalácia periventricular, em uma grande coorte de infantes com muito baixo peso. Resultados: Contrário ao mostrado em outros artigos, nenhuma das variantes genéticas analisadas influenciou significativamente a frequência de hemorragia intraventricular ou de leucomacia periventricular. Carreadores do polimorfismo Val34Leu do gene do fator XIII, **apresentaram um aumento na taxa de sepse e no tempo de internação**, quando comparado com não-carreadores. Foi visto que o polimorfismo 323 del/ins do fator VII é **um fator de proteção em potencial contra displasia broncopulmonar**.

## **6.2 Estudo de pacientes**

O estudo compreendeu 58 crianças que foram internadas na Unidade de Pacientes Graves, tiveram avaliação de polimorfismo genético para pelo menos uma citocina e apresentavam dados do período neonatal nos registros do Departamento de Neonatologia do Instituto Fernandes Figueira.

### 6.2.1 Características Clínicas e Demográficas da população estudada

Para determinar um possível impacto da idade gestacional nas demais características clínicas observadas, as análises demográficas e clínicas foram estratificadas em dois grupos (Tabela 3): Prematuro e A Termo. A idade gestacional da população foi a média de  $244 \pm 4.4$  dias ou  $35.2$  semanas  $\pm 0.63$  EPM.

<b>Tabela 6 - Diferenças em características clínicas e demográficas entre crianças nascidas a termo e pré-termo</b>			
<b>Características da população</b>	<b>Prematuros n=34 (59%)</b>	<b>A Termos n=24 (41%)</b>	<b><math>\chi^2</math>; p- valor</b>
<b>Cor da Pele</b>			
Branco	15 (44%)	16 (67%)	$\chi^2=2$ ; p= 0.15
Não-Branco	19 (56%)	8 (33%)	
<b>Gênero</b>			
Feminino	12(25%)	12 (50%)	$\chi^2=0.72$ ; p= 0.39
Masculino	22(75%)	12 (50%)	
<b>Mal Formação Congênita</b>			
Presente	17(50%)	23 (96%)	<b><math>\chi^2=11.75</math>; p= 0.0006</b>
Ausente	17(50%)	1(4%)	
<b>Bolsa Rota</b>			
Presente	19 (56%)	9 (38%)	$\chi^2=1.23$ ; p= 0.26
Ausente	15 (44%)	15 (62%)	
<b>Via de Parto</b>			
Cesárea	17(50%)	18(75%)	$\chi^2=2.7$ ; p= 0.10
Normal	17(50%)	6 (25%)	
<b>Sepse Neonatal</b>			
Sepse	28 (82%)	12 (50%)	<b><math>\chi^2= 5.45</math> ;p= 0.01</b>
Ausência de Sepse	6 (18%)	12 (50%)	
<b>Acesso Profundo</b>			
Presente	24(71%)	12(50%)	$\chi^2=1.73$ ; p= 0.18
Ausente	10(29%)	12(50%)	
<b>Nutrição parenteral</b>			
Presente	26 (76,4%)	6 (25%)	<b><math>\chi^2=13.06</math>; p= 0.0003</b>
Ausente	8 (23,5%)	18 (75%)	
<b>Ventilação Mecânica</b>			
Presente	19 (55,8%)	8 (33,3%)	$\chi^2=2.04$ ; p= 0.15
Ausente	15 (44,1%)	16 (66,6%)	

#Valor de p associado ao Teste  $\chi^2$  (Pearson) com correção de Yates.

Dos 58 incluídos, 34 (59%) nasceram prematuros (com idade gestacional inferior a 37 semanas de gestação ou <259 dias) e 24 (41%) nasceram a termo (com idade gestacional superior a 37 semanas de gestação).

Em relação ao gênero, embora tenha sido observado predomínio do gênero masculino entre os prematuros, a distribuição de gênero entre o grupo nascido a termo e pré-termo não mostrou diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2=0.72$ ;  $p=0.39$ ).

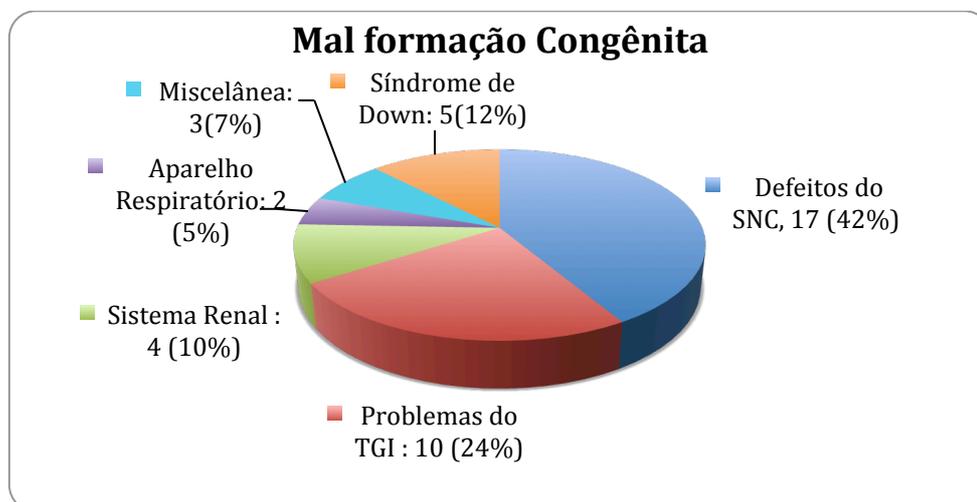
Em relação à etnia, também não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo de crianças que nasceram prematuras e a termo ( $\chi^2=2$ ;  $p=0.15$ ). É importante ressaltar que a etnia não-branco corresponde aos negros, índios e mestiços.

Quanto à necessidade de acesso venoso profundo, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de crianças nascidas a termo e pré-termo ( $\chi^2=1.73$ ;  $p=0.18$ ). Quando analisamos esse dado notamos que 12 (50%) das crianças nascidas a termo necessitaram de uso de acesso profundo, sendo que somente 7 (58.3%) entre as 12 (50%) crianças que necessitaram de acesso profundo apresentaram sepse neonatal mas 100% apresentavam mal formação congênita.

Do total de crianças incluídas no estudo, 40 (68,9%) apresentavam malformação congênita. Foi observada uma diferença estatisticamente significativa para a presença de malformação congênita entre o grupo de crianças nascidas a termo e o grupo pré-termo, com predomínio no grupo dos nascidos a termo ( $\chi^2=11.75$ ;  $p=0.0006$ ). Como a presença de malformações congênicas não levou a interrupção precoce do parto, julgamos importante descrever os tipos de malformações encontradas. As malformações mais frequentes foram: as afecções do sistema nervoso central (42%), gastrointestinal e defeitos de parede abdominal (24%), as doenças genéticas como a Síndrome de Down (12%), Síndrome Prune-Belly e alterações do sistema renal (10%), malformação do

aparelho respiratório (5%), e displasia esquelética e teratoma sacrococcígeo (7%) englobadas como Miscelânea (Gráfico 5 ).

Gráfico 5 - Diagnósticos de Mal formação Congênita observadas na população do estudo.



Observamos que 48,2% das crianças incluídas no estudo apresentavam bolsa rota com mais de 24h do momento do nascimento. Apesar de ter sido observado um número maior de crianças com bolsa rota por mais de 24h entre os prematuros, a diferença entre os dois grupos não foi estatisticamente significativa ( $\chi^2=1.2$ ;  $p= 0.26$ ).

O nascimento por cesariana foi observado em um grande número das crianças incluídas no estudo (60,3%). Não foi observada diferença estatisticamente significativa na distribuição de nascimentos por parto cesariano entre o grupo de crianças nascidas a termo e pré-termo ( $\chi^2=2,7$ ;  $p= 0.10$ ).

Outro dado clínico importante observado foi que 28 pacientes (48%) foram submetidos à cirurgia durante a internação na UTI Neonatal. As patologias mais frequentes que necessitaram intervenção cirúrgica foram: enterocolite necrotizante; correção cirúrgica de atresia de esôfago; gastrosquise; onfalocele; hérnia diafragmática; hidrocefalia com necessidade de derivação ventrículo peritoneal; correção cirúrgica de mielomeningocele e teratoma sacrococcígeo.

Foi observada uma diferença estatisticamente significativa na distribuição de sepse neonatal entre crianças nascidas a termo e pré-termo, com predomínio de sepse neonatal entre os prematuros ( $\chi^2=5.45$ ;  $p=0.01$ ). Em relação ao peso de nascimento, encontramos média de  $2.270g \pm 121.9$  (erro padrão da média) e para os bebês a termo encontramos 3.107 gramas e 1.632 gramas para os prematuros. Observamos que houve diferença estatisticamente significativa ( $p<0.05$ , teste T de *Student*) entre o peso de nascimento entre o grupo que desenvolveu sepse neonatal (média=1953,5g) e aquele que não desenvolveu (média=2973,8g).

Não foi observada associação entre o desenvolvimento de sepse neonatal e: presença de bolsa rota há mais de 24h antes do parto ( $\chi^2=0,45$ ;  $p=0,49$ ); utilização de antibiótico antes do parto ( $\chi^2=1.67$ ;  $p=0,19$ ); tipo de parto ( $\chi^2=0.13$ ;  $p=0,71$ ); e presença de malformação congênita ( $\chi^2=1.63$ ;  $p=0,20$ ).

Com relação as características demográficas, também não foi encontrada associação entre gênero ( $\chi^2=9 \times 10^{-4}$ ;  $p=0,97$ ) ou etnia ( $\chi^2=0,004$ ;  $p=0,94$ ) e o desenvolvimento de sepse neonatal. Entretanto, foi observada associação estatisticamente significativa entre alguns fatores nosocomiais tais como: presença de acesso profundo ( $\chi^2=4,6$ ;  $p=0,03$ ), uso de nutrição parenteral ( $\chi^2=13,4$ ;  $p=0,0002$ ) assim como necessidade de ventilação mecânica ( $\chi^2=7.7$ ;  $p=0,005$ ) e o desenvolvimento de sepse neonatal. O tempo médio em ventilação mecânica invasiva foi  $200,79 \pm 63,98$  (EPM).

Em destaque, 41 recém-nascidos (70.7% de todos os pacientes) tinham swab vaginal ou urinocultura maternos **negativa para o *Streptococcus* do Grupo  $\beta$  Hemolítico**, apenas 3 (5.2%) com resultado de cultura de swab positiva, e em 14 (24.1%) não havia relato no prontuário. Adicionalmente, apenas um paciente possuía história de exposição vertical ao HIV e um caso de gêmeos univitelinos.

## 6.2.2 Estudo de medidas de associação entre os SNPs e o desenvolvimento de sepse neonatal

Foram genotipados 95% dos pacientes incluídos do estudo para polimorfismo TNF -308; 91,3% para LTA +252; 87,9% para IL-6 -174; 82,7% para TNF -863; 91,3% para IL-10 -819 e 94,8% para MIF -173 a partir de material genético oriundo de swab oral ou amostras de sangue periférico.

A distribuição dos genótipos mostrou estar em equilíbrio dentro da Lei de *Hardy-Weinberg* no grupo controle, composto por crianças que não apresentaram sepse no período neonatal (SNP LTA +252=1,11; SNP IL-6 -174=2,88 ; SNP TNF -863= 2,77; SNP IL-10 -819= 2,88; SNP MIF -173= 0,17). Contudo, isto não foi observado com os genótipos de TNF -308, visto que o  $\chi^2$  (igual a **5,41**) foi superior ao valor-limite 3,841, não estando este marcador em EHW. Porém, em estudo anterior, também realizado pelo Laboratório de Fisiopatologia Humana do IFF, com mesmo banco de dados e maior tamanho amostral, o Teste  $\chi^2$  no grupo de crianças saudáveis e pacientes, sendo consideradas em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) as populações que apresentaram resultados abaixo de 3,84.

Dentre os 58 pacientes incluídos no estudo, 40 (69%) apresentaram sepse e 18 (31%) não evoluíram com sepse no período neonatal.

Foi analisado o desequilíbrio de ligação entre LTA +252 e TNF -308, com  $D'$  foi de 0.999366 e o  $R^2 = 0.4606543$ . Entre TNF -308 e TNF -863 o  $D'$  foi de 0.9970422 e o  $R^2 = - 0.1444548$ . Além de entre o LTA +252 e TNF -863, com  $D' = 0.9988816$  e o  $R^2 = - 0.3139655$ , indicando a ausência de associação entre os SNPs em todos os grupos no nosso estudo.

No grupo de crianças que não desenvolveram sepse neonatal, não foi identificado o genótipo menos frequente dos seguintes SNPs: SNP TNF -308 (AA); SNP TNF-863 (AA), SNP IL6 -174 (CC); e SNP IL10 -819 (CC). A comparação das frequências dos genótipos, alelos, carreadores e haplótipos entre o grupo de crianças que desenvolveram sepse neonatal e aquelas que não evoluíram com sepse neonatal está detalhada na Tabela 3.

Não foi observada associação estatisticamente significativa entre os genótipos, alelos e carreadores dos SNPs TNF-308, LTA-252, IL-6-174, TNF-863, IL-10-819 e MIF-173 e o desenvolvimento de sepse neonatal quando foi estudada a população total do estudo e quando estudada apenas a população de prematuros (Tabela 4). A análise estatística haplotípica não foi possível (na tabela: ND ou não disponível).

Tabela 7 - Frequências de genótipos e alelos para SNPs com ou sem sepse na população total do estudo

Genótipo / Alelo	não sepse n=18 (33%)	sepse n= 40(67%)	OR (CI 95%; p-valor) SEM Co-variáveis *	OR (CI 95%; p-valor) COM Co-variáveis*
<b><i>TNF -308</i></b>				
GG	15 (88%)	28 (74%)	Referência	Referência
GA	2 (12%)	9 (24%)	2.4 (0.4-12.6; p=0.2975)	1.06 (0.14 -7.8 ; p= 0.94)
AA	0	1 (3%)	ND	ND
Total	17 (94%)	38 (95%)	p-global= 0.3732	p-global=0.3731
Alelo A	2 (6%)	11 (14%)	2.7 (0.2- 24; p=0.3777)	2.89 (0.22-37; p=0.41)
Alelo G	32(94%)	65 (86%)	Referência	Referência
Carreador A	2 (12%)	10 (27%)	2.6 ( 0.5 - 13; p= 0.2397)	0.38 (0.03-4.54;p= 0.44)
<b><i>LTA +252</i></b>				
AA	7 (41%)	13 (36%)	Referência	Referência
GA	6 (35%)	19 (53%)	1.7 (0.4- 6.2; p= 0.4206)	6.8 (0.51-91.9- 8.9; p=0.14)
GG	4 (24%)	4 (11%)	0.5 (0.1- 2.8;p= 0.4656)	1.5(0.10- 22.7); p= 0.75)
Total	17 (94%)	36 (90%)	p-global= 0.3742	p-global= 0.3741
Alelo A	20 (59%)	45 (62%)	Referência	Referência
Alelo G	14 (41%)	27 (38%)	0.8 (0.2- 2.7; p= 0.7976)	1.17 (0.20-6.69; p=0.85)
Carreador G	10 (59%)	23 (64%)	1.2 (0.3 - 4.0; p= 0.7227)	3.7(0.4- 33.9; p= 0.24)
<b><i>IL6 174</i></b>				
GG	8 (5%)	21 (60%)	Referência	Referência
GC	8 (5%)	13 (37%)	0.6 (0.1- 2.0; p= 0.4333)	0.82 (0.17- 3.83; p=0.48034)
CC	0	1 (3%)	ND	ND
Total	16 (89%)	35 (88%)	p-global= 0.5024	p-global=0.5024
Alelo C	8 (25)	15 (21%)	0.7 (0.1-3;p=0.6418)	0.90 ( 0.15- 5.2;p= 0.91)
Alelo G	24 (75%)	55 (79%)	Referência	Referência
Carreador C	8 (5%)	14 (4%)	0.6 (0.2- 2.1; p= 0.5045)	0.83( 0.1- 3.9; p = 0.82)
<b><i>IL10 819</i></b>				
CC	8 (5%)	9 (24%)	Referência	Referência
CT	8 (5%)	21 (57%)	2.3 (0.6-8.1; p=0.1851)	1.41 (0.3-6.5; p=0.66)
TT	0	7 (19%)	ND	ND
Total	16 (89%)	37 (93%)	p-global= 0.02665	p-global=0.02665
Alelo C	24 (75%)	39 (53%)	Referência	Referência
Alelo T	8 (25%)	35 (47%)	2.6 ( 0.7- 9.9 ; p=0.1362)	1.53 ( 0.30-7.77 ; p= 0.60)
Carreador T	8 (5%)	28 (76%)	3.1 (0.9- 10; p= 0.0716)	1.4(0.31- 7.00 ; p= 0.62)
<b><i>MIF 173</i></b>				
GG	7 (44%)	20 (51%)	Referência	Referência
GC	7 (44%)	13 (33%)	0.6 (0.1 -2.2; p=0.5025)	0.09 (0.004 -2.44; p=0.15)
CC	2 (12%)	6 (15%)	1.0 (0.1- 6.4; p=0.9580)	2.76 (0.16- 45.8; p=0.47)
Total	16 (89%)	39 (98%)	p-global= 0.7681	p-global=0.76
Alelo C	11 (34%)	53 (68%)	0.9 (0.2- 3; p=0.8675)	1.36 (0.17 - 10.7; p=0.76)
Alelo G	21 (66%)	25 (32%)	Referência	Referência
Carreador C	11 (34%)	25 (32%)	0.7 ( 0.2- 2.3; p= 0.6123)	0.55 ( 0.06- 4.8; p= 0.59)
<b><i>TNF -863</i></b>				
AA	0	1 (3%)	ND	ND
CC	11 (79%)	25 (74%)	Referência	Referência
CA	3 (21%)	8 (24%)	1.1 (0.2- 5.2); p=0.8350)	0.33 (0.02- 4.5; p=0.41)
Total	14 (78%)	34 (85%)	p-global= 0.6899	p-global=0.689926
Alelo C	25 (0.89)	58 (85%)	Referência	Referência
Alelo A	3 (11%)	10 (15%)	1.4 (0.2-10; p= 0.7145)	0.50 (0.02- 9.55; p= 0.65)
Carreador A	3 (21%)	9 (27%)	1.32 ( 0.3- 5.8; p= 0.7144)	1.98 ( 0.29 - 13.42; p= 0.48)
<b>Haplótipos</b>				
252A/-308G/-863A	0.09183	0.14594	ND	ND
252A/-308G/-863C	0.49691	0.48695	ND	ND
252G/-308A /-863A	NA	0.00000	ND	ND
252G/-308A /-863C	0.06453	0.14103	ND	ND
252G/-308G /-863A	0.01163	0.00000	ND	ND
252G/-308G /-863C	0.33510	0.22608	ND	ND

\*OR e p-valores ajustados para as covariáveis prematuridade, presença do acesso profundo, sexo e etnia.

ND- Resultado não disponível.

Tabela 8 - Frequências de genótipos e alelos para SNPs na sepse somente entre os prematuros

Genótipo / Alelo	não sepse n=6 (17,6%)	sepse n=28(82,3%)	OR (CI 95%; p-valor) SEM Co-variáveis *	OR (CI 95%; p-valor) COM Co-variáveis*
<b><u>TNF -308</u></b>				
GG	5 (83%)	20(71%)	Referência	Referência
GA	1 (17%)	8 (29%)	1.17(20.2- 19.9; p= 0.55)	3.05 (0.19- 47.3;p= 0.42)
AA	0	0	ND	ND
Total	6 (100%)	28 (100%)	p-global=0.53	p-global= 0.53
Alelo A	1 (8%)	48(86%)	1.8 ( 0.08 - 40; p= 0.6999)	2.4(0.07- 82;p= 0.61)
Alelo G	11(92%)	8(14%)	Referência	Referência
Carreador A	1 (17%)	8(29%)	2 (0.2-20, p = 0.5544)	3.0 (0.19- 47; p =0.42)
<b><u>LTA +252</u></b>				
AA	4 (8%)	9 (33%)	Referência	Referência
GA	0	15(56%)	ND	ND
GG	1 (2%)	3 (11%)	1.3 (0.1- 17; p = 0.82)	1.33( 0.10-17; p= 0.82)
Total	5 (83,3%)	27 (96,4%)	p-global= 0.027	p-global= 0.027
Alelo A	8 (80%)	33 (61%)	Referência	Referência
Alelo G	2 (20%)	21 (39%)	2.5 (0.24 - 26;p= 0.4307)	2.8 ( 0.15- 50; p= 0.48)
Carreador G	4 (8%)	24 (89%)	8 (0.7 - 82; p= 0.0806)	20.64(0.64-656;p= 0.08)
<b><u>IL6 174</u></b>				
GG	3 (60%)	15 (58%)	Referência	Referência
GC	2 (40%)	10 (38%)	3130272 (0.00-Inf;p= 0.99)	2.02(0.13-29;p= 0.60)
CC	0	1 (4%)	ND	ND
Total	5 (83,3%)	26 (92,9%)	p-global= 0.83	p-global=0.83
Alelo C	2 (20%)	12 ( 23%)	1.2 (0.11- 12; p= 0.88)	1.2 (0.11- 12; p= 0.88)
Alelo G	8 (80%)	40 (77%)	Referência	Referência
Carreador C	2 (40%)	11 (42%)	1.1 (0.15-7.7; p= 0.92)	2.09 (0.14 -29.65 ; p= 0.58)
<b><u>IL10 819</u></b>				
CC	2 (40%)	4 (15%)	Referência	Referência
CT	3 (60%)	17 (65%)	2.8x10E5 (0.3- 23; p= 0.32)	0.53(0.02- 13.68; p= 0.70)
TT	0	5 (19%)	ND	ND
Total	5 (88,3%)	26 (92,9%)	p-global=0.24	p-global= 0.24
Alelo C	7 (70%)	25 (48%)	Referência	Referência
Alelo T	3 (30%)	27 (52%)	2.5 ( 0.32- 20; p= 0.3796)	1.02(0.08-12.65;p= 0.98)
Carreador T	3 (60%)	22 (84%)	3.7 ( 0.45 - 29.4; p= 0.2214)	0.55 (0.02- 14.3;p= 0.72)
<b><u>MIF 173</u></b>				
GG	3 (75%)	16 (57%)	Referência	Referência
GC	0	9 (32%)	ND	ND
CC	1 (25%)	3 (11%)	ND	ND
Total	4 (66,7%)	28 (100%)	p-global= 0.21	p-global= 0.21
Alelo C	2 (25%)	15 (27%)	1.0 ( 0.09 - 12; p= 0.93)	3 ( 0-3; p= 0.91)
Alelo G	6 (75%)	41 (73%)	Referência	Referência
Carreador C	1 (25%)	12 (43%)	ND	ND
<b><u>TNF -863</u></b>				
AA	1 (25%)	8 (32%)	Referência	Referência
CA	3 (75%)	17 (68%)	1.41(0.12-15.78;p= 0.77)	1.17(0.04- 32;p= 0.92)
CC	4 (67%)	25 (89,3%)	p-global= 0.77	Referência
Total	7 (0.88)	48 (84%)	Referência	p-global= 0.77
Alelo C	1 (12%)	8 (16%)	1.3 (0.05- 31;p= 0.85)	1.89(0.14-24.03;p= 0.62)
Alelo A	1 (25%)	8 (32%)	1.4 (0.1- 16; p= 0.77)	2.6 (0.18 - 37; p= 0.48)
Carreador A	1 (25%)	8 (32%)	1.4 (0.1- 16; p= 0.77)	1.17 (0.04 - 32; p= 0.92)
<b>Haplótipos</b>				
252A/-308G/-863A	0.10486	0.15639	ND	ND
252A/-308G/-863C	0.70695	0.46254	ND	ND
252G/-308A /-863A	0.02222	0.00001	ND	ND
252G/-308A /-863C	0.061123	0.14285	ND	ND
252G/-308G /-863C	0.10485	0.23821	ND	ND
252A/-308G/-863A	0.10486	0.15639	ND	ND
252A/-308G/-863C	0.70695	0.46254	ND	ND
252G/-308A /-863A	0.02222	0.00001	ND	ND
252G/-308A /-863C	0.061123	0.14285	ND	ND

\*OR e p-valores ajustados para as covariáveis presença do acesso profundo, uso de nutrição parenteral, uso de ventilação mecânica, etnia e gênero. ND- Resultado não disponível

## DISCUSSÃO

Ao contrário da expectativa original de alguns grupos<sup>85,109</sup>, décadas de tentativas em vários centros de pesquisa<sup>178,199-200</sup> não conseguiram definir um ou mais SNPs suficientes para prever a susceptibilidade e à sepse e fundamentar o prognóstico, de forma a permitir a implementação como parte da rotina em UTIs Neonatais, com vistas à melhoria da prática médica<sup>81,91,201</sup>, pode ser claramente visualizado a partir da revisão sistemática que realizamos, que descreve resultados frequentemente negativos, em grande proporção de estudos.

Mesmo nos casos onde os genes portadores dos polimorfismos de interesse possuem um impacto relevante na sepse em adultos e em crianças na faixa etária pediátrica, tais achados não foram replicados na sepse neonatal<sup>91,194</sup>. Em estudos onde associações significativas foram relatadas entre sepse neonatal e genes com polimorfismos, os resultados são frequentemente inconsistentes com os realizados por outros grupos em diferentes períodos, e/ou com diferentes populações de neonatos. Com frequência ainda maior, fortes associações foram observadas inicialmente em pequenos estudos, ou coortes de médio porte, mas não confirmadas em grupos com amostras maiores. Nenhuma das grandes coortes estudadas identificou um importante efeito de qualquer um dos genes candidatos a susceptibilidade à sepse, apesar de fortes correlações com condições predisponentes, como a prematuridade<sup>196</sup>.

É importante frisar que tal impasse não é dependente da metodologia utilizada nos estudos. Por exemplo, Abu Maziad *et al.*<sup>182</sup> usou uma abordagem baseada na família (teste de desequilíbrio de transmissão) para identificar múltiplos genes candidatos à associação com a sepse neonatal em uma coorte relativamente grande, sendo capaz de detectar associações moderadas ou limítrofes nos genes para PLA2, subtipos de TLR e

IL-10. Além disso, foram utilizadas estratégias adicionais na definição de fenótipos com sepse com base em vários parâmetros para melhorar a sensibilidade e tomando cuidado para corrigir o efeito de comparações múltiplas. Nenhum dos polimorfismos mais estudados a partir de outros trabalhos (TNF ou IL-6) chegou a entrar na lista de candidatos promissores; por outro lado, os candidatos evidenciados por Maziad *et al*<sup>182</sup>. (PLA-2, TLR e IL-10) também preenchem os critérios para a categoria de genes imunes e inflamatórios, o que de certa maneira reforça a idéia de que é neste grupo de genes que eventualmente será encontrado um candidato clinicamente útil.

Um aspecto importante desses estudos envolve a diversidade étnica das populações examinadas. Em pelo menos um estudo bem controlado<sup>191</sup>, a etnia desempenhou um papel importante na modificação de resultados em associações entre polimorfismos em genes imunologicamente relevantes (IL-6, CD14) e sepse. Etnia é uma questão presente em outros estudos em Israel<sup>196</sup>, EUA<sup>84</sup> e Europa, este último refletindo a imigração recente originária da África e do Oriente Médio<sup>184</sup> ou comparando populações caucasianas amplamente separadas<sup>187</sup>. A interpretação dos dados de genotipagem pode ser afetada pela etnia da população de interesse, e isto representa um fator limitante para a aplicação desta abordagem aos lactentes em todo o mundo.

Outra questão importante é a da complexidade dos polimorfismos envolvidos, o que pode ser bastante variável, desde os SNPs no caso do TNF- $\alpha$ <sup>91</sup> até eventos complexos envolvendo inserção/deleção no caso de ECA<sup>194</sup>. Esta complexidade é máxima no caso da MBL<sup>187</sup>, uma vez que as mutações conhecidas muitas vezes impedem a polimerização necessária para gerar uma proteína funcional.

A MBL representa uma situação especial<sup>183,187</sup>, pois esta proteína apresenta uma série de polimorfismos que interferem com a montagem de multímeros funcionais. Como consequência, os indivíduos homozigotos para qualquer mutação, assim como os heterozigotos para duas mutações distintas, apresentam grave deficiência nesse fator

microbicida. No entanto, os heterozigotos possuindo um alelo do tipo selvagem podem produzir multímeros funcionais de MBL, constituídos apenas por cadeias não-mutantes, e através da exposição repetida a agentes patogênicos ocorre um estímulo à produção desses multímeros funcionantes, tornando difícil detectar a imunodeficiência. Neste caso, a dissociação entre o genótipo e sua expressão fenotípica representam um grande problema. Na verdade, a variável clinicamente relevante não é qual alelo a criança possui, mas sim o quanto de MBL funcional produz<sup>183,187-188</sup>. Há um lado bom para isso, porque a mensuração de MBL pode eventualmente demonstrar ser um melhor preditor de sepse que a genotipagem, e porque a terapia de reposição de MBL deve ser útil naqueles que não a possuem ou a têm em quantidade insuficiente. Uma questão importante, que não pode ser resolvida no momento, é se a administração MBL para crianças carentes de multímeros totalmente funcionais podem induzir à produção de anticorpos contra proteína MBL exógena, quando esta for administrada como terapia.

Sendo assim, uma reavaliação crítica desta abordagem é necessária. Qualquer tentativa de fazer uma triagem para SNPs em RN em UTIs neonatais, por conta de associações com sepse, depende de uma série de pressupostos, como se segue: a) que o polimorfismo está associado com sepse e o resultado da genotipagem faz parte, de alguma forma no processo de decisão quanto a se a terapia antimicrobiana agressiva deve ou não ser instituída; b) que esta associação não é dependente de etnia, das definições complexas de haplótipos ou a natureza dos patógenos envolvidos; c) que o custo e trabalho envolvido na obtenção dessas informações genéticas são justificadas pelos benefícios esperados.

Idealmente, tais polimorfismos devem ser poucos e não muitos, para reduzir o trabalho e os custos e maximizar a velocidade de resposta no momento da decisão de instituir a terapia nos neonatos, o que é fundamental neste cenário. Assim, os polimorfismos identificados nos resultados dos recém nascidos suscetíveis, deveriam ser

o objetivo último destes esforços de triagem. Tal aspiração até o momento não foi realizada. Ao invés disso, grandes estudos de coorte e testes de múltiplos genes candidatos sugerem que vários genes têm um impacto sobre a sepse, mas que esse impacto é limitado. Determinar todos eles seria impraticável, especialmente porque é difícil determinar a relevância no processo de decisão de qualquer um deles isoladamente.

Gostaríamos de sugerir, ao contrário, que nos casos em que um impacto foi mostrado, uma avaliação mais aprofundada dos polimorfismos candidatos devem envolver análise aprofundada de sua importância funcional, antes de que seja feita alguma recomendação para a implementação em um ambiente clínico.

Nosso estudo com pacientes permitiu a observação das frequências genotípicas, alélicas e haplotípicas de polimorfismos dos genes do TNF na posição -308 e -863 ; IL-6 na posição -174; da LTA na posição +252; MIF na posição -173; e IL-10 na posição -819, em crianças saudáveis e pacientes criticamente enfermos, além de correlação com características demográficas e clínicas dos pacientes.

Inicialmente, foram analisadas neste estudo características demográficas, tais como **gênero, etnia, peso ao nascer e idade gestacional, tipo de via de parto, presença de bolsa rota, mal formação fetal** que já foram relacionadas na literatura com evolução clínica da sepse neonatal.

Com relação ao **gênero**, não observamos diferença estatisticamente significativa entre o grupo de crianças saudáveis e o grupo de pacientes. Da mesma forma, não foi encontrada diferença significativamente estatística com relação ao gênero nos pacientes que desenvolveram sepse, apenas um predomínio de prematuros do sexo masculino que não alcançou significância. Esta maior incidência no sexo masculino tem sido encontrada também por outros autores, que apresentam a hipótese de que esta maior predisposição possa estar ligada a um gene localizado no cromossomo X e envolvido com a função do

timo ou com a síntese de imunoglobulinas, representando um fator de proteção ao sexo feminino<sup>202</sup>.

Há estudos que sugerem que os hormônios sexuais possam exercer efeitos reguladores potentes em funções imunes variadas, sendo os androgênios imunossupressores e os estrogênios protetores, em sepse induzida em modelos animais<sup>203</sup>.

Estudos genéticos também ressaltaram a maior vulnerabilidade do sexo masculino, como o estudo de Schröder et al.(2000)<sup>204</sup>, que observou aumento da taxa de letalidade estatisticamente significativa em homens homozigotos para o LTA +252 AA quando comparadas aos outros genótipos, e um estudo americano que mostrou predisposição à sepse grave no SNP LTA +252, modulada pelo gênero e idade<sup>205</sup>.

Com relação à **idade gestacional** houve diferença estatisticamente significativa entre crianças saudáveis e pacientes que evoluíram com sepse neonatal. Os prematuros foram mais susceptíveis à sepse, assim como os pacientes com o acesso venoso profundo. Levando em consideração que uma grande proporção (71%) de prematuros no estudo utilizaram acesso venoso profundo, pode-se considerar a presença do cateter como um agravante ao desenvolvimento da sepse neonatal.

Tendo em vista a maior sobrevida de prematuros e de recém-nascidos de baixo peso, submetidos a internações prolongadas e procedimentos invasivos indispensáveis a seus cuidados<sup>206</sup>, a maior suscetibilidade às infecções, somada aos fatores a que são expostos durante o tratamento, resulta em taxas de infecções superiores às de outras populações<sup>207</sup>. Durante a internação, o neonato é exposto a uma variedade de patógenos maternos e hospitalares, que se tornam invasivos pelo status imunológico deficitário<sup>206</sup>.

Com relação à **cor da pele**, não houve diferença estatisticamente significativa entre prematuros e a termo para o desenvolvimento de sepse. Porém, observamos que a maioria dos prematuros possuíam etnia não-branca. A associação entre raça e mortalidade infantil é bastante estudada em países como os EUA<sup>208</sup>, cujas taxas elevadas de mortalidade

neonatal entre os recém-nascidos negros resultam de excesso de nascimentos prematuros e da restrição de crescimento fetal<sup>209-210</sup>.

Atualmente, sabe-se que a frequência de muitos polimorfismos varia entre diferentes grupos étnicos e que comparações devem ser realizadas dentro um mesmo grupo etnicamente bem definido<sup>10</sup>. Os estudos de associação de genes selecionados e contrastantes frequências alélicas usando casos *versus* controle, são úteis em genes com pequeno efeito e não dependem de estudos familiares. Porém, estão mais sujeitos à fatores de confundimento, sendo a etnia o mais relevante. Se os casos e controles não são etnicamente comparáveis, a diferença de frequência dos alelos entre os grupos, associados ou não com a doença, pode originar resultados falso-positivos através deste artefato de estratificação.

Os investigadores tem tentado prevenir este viés, restringindo os sujeitos do estudo a um determinado grupo étnico; no entanto, origem étnica é frequentemente difícil de definir com precisão. Uma solução é usar desenhos caso-controle com amostras populacionais pareadas de forma homogêneas e aleatórias<sup>71</sup>, o que pode ser muito difícil de obter em populações heterogêneas como a norte-americana.

Adicionalmente, a frequência de alelos polimórficos é influenciada pela ancestralidade, sendo encontradas diferenças na distribuição alélica entre populações etnicamente distintas em diversos estudos<sup>212-218</sup>.

No presente estudo, devido ao alto grau de miscigenação da população brasileira, os pacientes e bebês saudáveis foram primeiramente agrupados segundo a cor da pele, conforme a recomendação oficial do IBGE. Em virtude da dificuldade adicional de determinação da cor da pele em lactentes jovens, dificultando estudos de associação genotípica, a população estudada foi categorizada de forma binária, em “brancos” e “não-brancos”. Ainda assim, por ser o grupo de “brancos” no Brasil altamente miscigenado e

não ter sido realizado estudo genético para determinação de ascendência, esta categorização reflete apenas divisão de raça segundo o fenótipo, na população estudada.

Como dentro dos grupos de pacientes incluídos existia uma ampla variação de características clínicas entre os classificados prematuros e a termo, representando um importante fator de confundimento, foi realizada a estratificação desses pacientes em 2 grupos distintos para análise estatística.

As demais características demográficas foram mantidas como covariáveis e ajustadas em todas as análises estatísticas realizadas.

Neste estudo, foram analisadas características clínicas de todos os pacientes incluídos, avaliado o desfecho de sepse neonatal em cada paciente e realizada a genotipagem.

Por serem atendidos em um instituto materno-infantil de alta complexidade, sendo referência municipal e estadual para várias especialidades médicas, como pré-natal de alto risco fetal, neurologia e pneumologia infantis, genética, neonatologia, e cirurgia infantil, os pacientes do nosso estudo têm perfil de doenças crônicas e complexas<sup>219</sup>. Portanto, já era esperado o percentual elevado de crianças portadoras de malformações na população estudada (68.9%), havendo predomínio de malformações do SNC.

Em estudo realizado em 2004 por Maveira et al., com uma amostra de 73 neonatos portadores de cardiopatia congênita, a sepse esteve presente em 53 deles, dos quais 28 evoluíram para óbito, evidenciando uma taxa de letalidade de 53%<sup>220</sup>. Calil et al. (2001) observaram que o tempo de internação é um dado que remete à gravidade de algumas doenças que acometem os RN, levando-os rapidamente à morte, como as malformações congênitas e sepse precoce de origem materna<sup>207</sup>.

A diferença em relação à presença de **MF** entre os pacientes com e sem sepse apresentada no estudo foi a esperada, já que pacientes portadores de comorbidades normalmente possuem pior evolução do que os previamente hígidos.

Dentre os pacientes avaliados, o uso de cateter venoso central influenciou significativamente a evolução da sepse. Sendo este o sítio de infecção mais frequentemente relacionado à sepse neonatal tardia, nossos resultados são coerentes com os de trabalhos já publicados.

A permanência de recém-nascidos em UTIs neonatais, contribui para o aumento da exposição às infecções e da mortalidade decorrente, pelo número de vezes que são manipulados e submetidos a procedimentos invasivos<sup>206,207,221</sup>.

Em nosso estudo, houve vários aspectos limitantes na análise de prontuários e coleta de dados clínicos. Pretendíamos inicialmente avaliar se existia alguma associação entre a genotipagem dos alelos estudados e a natureza dos microorganismos observados nas culturas de sangue, urina e outras secreções, nos diagnósticos com sepse comprovada. Porém, surpreendentemente, apenas 9 hemoculturas tiveram positividade, tornando essa avaliação inviável. Vários fatores sabidamente influenciam a sensibilidade da hemocultura numa população neonatal, já que o volume total de um bebê corresponde a 80 ml/kg, e num prematuro com peso ao nascer de 1,7 kg (média encontrada em nosso estudo) a coleta de 3 ml de sangue apenas para hemocultura corresponde a 2% da volemia. Cabe ainda lembrar que lembrando que a coleta de amostra de sangue para hemocultura tem sensibilidade variável em função da farmacocinética do antibiótico.

Outro aspecto importante foi na disponibilidade aos dados clínicos, seja por dificuldade na recuperação de prontuário médico, pelo preenchimento de prontuários (muitas vezes feito por residentes em supervisão) ou pela inconsistência no diagnóstico de sepse neonatal por ausência de uniformidade ou protocolos clínicos.

Apesar da nossa tentativa de identificar fatores de risco maternos para o desenvolvimento da sepse neonatal, como feito por Stoll et al. (1996), em seu estudo sobre sepse neonatal tardia em recém-nascidos de muito baixo peso, não encontramos

associação estatisticamente significativa entre esses fatores e o aparecimento de sepse neonatal tardia<sup>222</sup>.

A prematuridade e o baixo peso são descritos como fatores neonatais relevantes para o surgimento da sepse tardia, uma vez que são as principais causas de ingresso dos neonatos em UTIs e o risco de infecção tardia aumenta com o decréscimo do peso ao nascimento e da idade gestacional<sup>2,18</sup>. Remington et al.(1995), descreveram uma taxa de mortalidade de 21% associada à sepse em recém-nascido de muito baixo peso<sup>202</sup>. Em nosso estudo, a mortalidade não foi avaliada, mas achamos uma diferença significativamente estatística na sepse no grupo dos prematuros.

Várias complicações da prematuridade estão associadas com o provável aumento da sepse tardia pela necessidade de tempo prolongado de internação e maior necessidade de procedimentos invasivos<sup>21,223</sup>. Nos pacientes sépticos no estudo a associação à presença de cateter venoso profundo foi significativamente estatística.

Segundo Grahan et al. (2006) em um estudo caso-controle com recém-nascidos de baixo peso em uma UTI, o uso de cateterismo venoso central por mais de 10 dias foi importante fator de risco para sepse neonatal tardia<sup>223</sup>. Não foi o objetivo primordial de nosso estudo levantar o tempo de uso de cateter. Por conseguinte, englobamos em acessos profundos o cateterismo umbilical, as disseções ou punções sob visualização e os cateteres epicutâneos.

Newman (2006) sugeriu como estratégia de prevenção, que a remoção do acesso venoso seja feita o mais breve possível, assim que a terapêutica tenha sido concluída para reduzir as chances de infecção tardia<sup>224</sup>.

Stoll et al. (1996) e Rimon et al., (2004) sugeriram em seus estudos que a via enteral deve ser iniciada o mais precocemente possível para reduzir o tempo de uso de parenteral, que está associado a um grande risco de infecção<sup>21-22</sup>.

Polin et al. (2003) relataram em sua pesquisa sobre infecção neonatal nosocomial, que a prevenção de nascimentos prematuros é uma das estratégias mais efetivas para promover a redução deste tipo de população de risco<sup>31</sup>.

Entretanto, a implantação desta medida não é fácil já que depende diretamente de uma boa assistência por parte dos serviços de saúde com a melhoria do atendimento à gestante.

Segundo Weber (2003), mais de 40% das mortes neonatais que ocorrem nos países em desenvolvimento são causadas por infecção<sup>226</sup>. Stoll et al., (1996) afirmou que nos primeiros três dias de vida aproximadamente 4,2% das mortes neonatais são causadas por sepse, 14,6% ocorrem entre quatro e sete dias, 36,2% entre oito e quatorze dias e 51,8% até 28 dias de vida<sup>21</sup>.

Isso mostra como é importante a identificação dos fatores de risco relacionados a esta doença e que medidas de prevenção devem ser adotadas para reduzir tais resultados. Algumas práticas podem, dessa maneira, ser adotadas como medidas de redução da incidência da sepse tardia.

É imprescindível o entendimento de que apesar de cuidados na prevenção à sepse neonatal, o prematuro tem maior susceptibilidade à doença, seja pela já conhecida resposta imune inata imatura, seja pela invasividade inevitável de procedimentos invasivos como cateteres profundos, intubação orotraqueal, ventilação mecânica, necessários à própria sobrevivência destes pacientes frágeis.

Apesar de estudos de polimorfismos genéticos na resposta inflamatória em adultos estarem associados à infecção, as tentativas de transpor tais resultados à população neonatal ainda não foram totalmente bem-sucedidas.

É notório lembrar que a fisiologia neonatal é bem peculiar, que a exposição à infecção precede o nascimento e diagnósticos como a Doença de Membrana Hialina (proveniente da prematuridade) e a Pneumonia se sobrepõem. O diagnóstico de sepse em

recém-nascidos sem confirmação microbiológica ainda é a maioria, e o espectro de sinais e sintomas é muito vasto. E, por vezes, o tratamento antimicrobiano é iniciado valorizando o componente ineficaz de defesa do hospedeiro nessa população.

No referente aos polimorfismos estudados por nós, foram escolhidos em virtude de sua associação e da susceptibilidade à sepse, já sugerida pelos poucos estudos existentes para a faixa etária neonatal.

Em relação à distribuição do TNF -308, o predomínio em ambos os grupos (prematuros e a termo) de homozigotos GG (aproximadamente 74% e 86%, respectivamente) e a presença de muito poucos homozigotos AA (0% e 1%) na população estudada foi similar às frequências descritas na literatura para a população brasileira<sup>225,227-228</sup>.

Em relação ao SNP *LTA* +252, *não houve predomínio claro de nenhum genótipo, porém tanto pacientes, quanto crianças prematuras quanto a termo, apresentaram maior quantidade de heterozigotos LTA +252 GA* (47 e 48%, respectivamente) em relação ao homozigoto AA (41 e 33%). A frequência do alelo A foi similar à descrita na literatura para a população brasileira<sup>229</sup>, sendo mais frequente o alelo A nos prematuros (64%) em a termo (57%).

No grupo de crianças saudáveis, a análise dos genótipos e alelos demonstrou distribuição de frequências genotípicas e alélicas em EHW, o que afasta possíveis erros relacionados à genotipagem, permite a verificação da frequência dos genótipos estudados em população similar aos pacientes envolvidos na análise, além de reafirmar a qualidade do presente estudo. Um estudo inglês demonstrou que o desvio do EHW em amostras aleatórias pode ser indicativo de problemas na genotipagem<sup>230</sup>. Erros em dados genotípicos podem acontecer devido a uma variedade de motivos, como desvios no grupo controle, trocas no manuseio das amostras e problemas no processo de genotipagem. A presença de erros na genotipagem em dados de indivíduos não relacionados tem impacto

considerável na análise de dados subsequentes. Mesmo pequenos erros (na faixa de 3%) já podem afetar adversamente as medidas do EHW.

A análise de ligação provou ser muito menos confiável para o estudo de doenças não-mendelianas por causa da elevada taxa de resultados falso-positivos. O estudo de traços poligênicos é dificultado pela falta de padrões de segregação familiares e a variabilidade do ambiente, como se poderia ocorrer com a exposição infecciosa. Identificação de alelos de fraca penetrância que contribuem para distúrbios comuns requer abordagens novas e mais poderosas<sup>10</sup>.

O alelo A do TNF -308 está associado com uma maior produção da citocina TNF<sup>10,76,77,79</sup> que quando muito aumentada resulta em desequilíbrio e resposta inflamatória sistêmica exagerada<sup>10-68</sup>. No entanto, a liberação inicial de TNF em quantidades aumentadas é essencial para uma resposta imune adequada<sup>203</sup>.

Assim, para mutações e polimorfismos serem preservados no genoma humano, apesar da predisposição a um desfecho deletério secundário a uma doença, uma vantagem na sobrevivência frente a outra doença (outra infecção ou neoplasias, por exemplo) é possível ou necessária<sup>83</sup>.

Os principais estudos publicados na literatura para avaliação da função genética na infecção são estudos de associação, que comparam a incidência de variações genéticas específicas em uma população com infecção e em uma população controle. A evidência de estudos de associação não é tão forte e deve preencher rigorosos critérios para aceitação.

Há várias limitações nos estudos de associação genética entre polimorfismos e sepse descritos na literatura. Em muitos destes estudos, a frequência do alelo variante ou de no grupo de pacientes com sepse é comparada com a frequência do mesmo alelo em uma população controle saudável. Entretanto, o grupo controle pode não ter sido exposto aos mesmos patógenos aos quais o grupo de pacientes com sepse foi exposto. Não se

pode concluir, a partir de tais comparações, que o grupo que desenvolveu sepse tem um risco aumentado de sepse, sem que exista um grupo controle similarmente exposto. Portanto, o grupo controle mais apropriado para comparação de estudos genéticos de associação com doenças infecciosas seria um grupo de pacientes com infecção similar que, no entanto, não desenvolveu sepse<sup>10</sup>.

Vários problemas metodológicos podem explicar muitas das discrepâncias encontradas entre os estudos de associação genética, como: poder estatístico limitado, populações heterogêneas com fatores de confundimento não reconhecidos, definições inadequadas dos fenótipos, presença de desequilíbrio de ligação e estratificação das populações.

Os resultados divergentes encontrados em estudos de associação genética na literatura vigente enfatizam a necessidade de estudos futuros com amostra maior, incluindo múltiplos polimorfismos e melhor desenhados no que diz respeito ao grupo controle, para identificar corretamente o grau de influência que a variabilidade genética tem na sepse<sup>10</sup>. Confirmações dos achados dos estudos já publicados, bem como associações subsequentes com outros polimorfismos genéticos, aguardam estudos populacionais de larga escala para esclarecer as relações entre fatores genéticos e não-genéticos possivelmente relacionados a tais desfechos<sup>92</sup>.

O presente estudo incluiu crianças de um único centro, o que talvez crie um viés na amostra em questão, dificultando a extrapolação dos resultados para outras populações.

No entanto, permitiu a uniformização do cuidado e a utilização de protocolos clínicos universais e específicos, sendo criteriosamente utilizados consensos e os padrões atualmente aceitos na literatura para definição de todos os desfechos utilizados nas correlações com os genótipos estudados. Isto ajuda a minimizar os erros de classificação

demográfica e clínica, diminuindo eventuais fatores de confusão no tratamento clínico disponibilizado aos pacientes.

Uma limitação do estudo é a miscigenação da população brasileira, o que impede a exclusão de fatores relacionados à raça, também impedindo a categorização criteriosa da população em questão.

A inclusão de pacientes com sepse neonatal precoce e tardia em um mesmo grupo, também pode configurar certa limitação na extrapolação dos resultados.

Foram levados em consideração os possíveis fatores de confundimento que poderiam alterar o impacto das variantes genéticas na gravidade e evolução das crianças sépticas em todas as análises estatísticas.

Uma limitação de estudos de associação da distribuição de SNPs com evolução clínica é que na maioria dos casos, investigadores descrevem a associação entre um polimorfismo específico e susceptibilidade a uma doença ou evolução clínica. Entretanto, o SNP que está sendo investigado pode não estar envolvido diretamente, mas estar proximamente ligado a outra variante genética efetivamente causadora da associação<sup>10</sup>.

Nenhum estudo de associação genotipou todos os sujeitos para todos os *loci* polimórficos ao mesmo tempo. Portanto, alguns destes polimorfismos podem apenas estar em desequilíbrio de ligação com o gene relevante, situado em um *locus* diferente<sup>83</sup>. Assim mesmo analisando os SNPs TNF -308 e LTA +252 simultaneamente, pode ser que nenhum dos dois SNPs seja o verdadeiro fator influenciando o desfecho, mas que ambos sejam marcadores ligados a outra variante genética relevante nesta região, que é rica em genes relacionados à resposta inflamatória sistêmica<sup>83</sup>.

No entanto, várias limitações para os estudos de associações deveriam ser levadas em conta quando se tenta transpor os resultados obtidos nos estudos realizados em coortes de adultos.

Uma outra limitação de vários estudos refere-se a indivíduos dentro dos grupos de

estudo e controle que são de diferentes grupos étnicos. É bem conhecido que a frequência de muitos destes polimorfismos varia entre os grupos étnicos e, conseqüentemente, as comparações só devem ser feita dentro de grupos étnicos semelhantes. O uso de controle gênicos de SNPs de amostras com etnia homogênea ajuda a evitar associações espúrias<sup>231</sup>.

Com base no fato de outros estudos na literatura, revistos na primeira parte dos nossos resultados, terem apresentado resultados predominantemente negativos, o achado de falta de associação estatisticamente significativa entre os genótipos, alelos e carreadores dos SNPs TNF-308, LTA+252, IL-6-174, TNF-863, IL-10-819 e MIF-173 SNPs com sepse neonatal é compatível com a literatura<sup>91,194</sup>. Entretanto, algumas questões importantes têm que ser consideradas nesse estudo. Um fator que merece atenção é que este estudo foi feito a partir de uma amostra de conveniência, com coleta de dados retrospectiva. Como as crianças incluídas nesse estudo foram aquelas que foram internadas posteriormente na UTI pediátrica, a nossa amostra conseqüentemente ficou privada das crianças que tiveram evoluções mais graves no período neonatal, evoluindo para óbito.

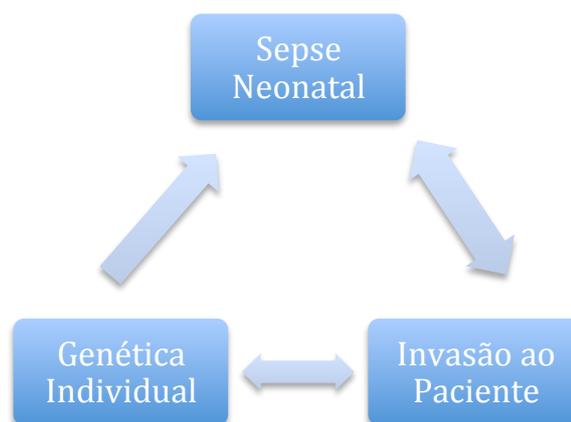
Um outro fator que prejudicou a análise foi a ausência no nosso grupo de crianças não-sépticas dos genótipos associados a evoluções mais graves na literatura, tais como o SNP TNF-308 AA, SNP TNF -863 AA, SNP IL6 -174 CC e IL10 -819 TT, o que pode ser resultante do pequeno tamanho da nossa amostra, mas também pode ser devido à exclusão das crianças que evoluíram para óbito no período neonatal.

## CONCLUSÕES

A imaturidade do sistema imunológico neonatal dos prematuros e/ou a deficiência individual específica à resposta inflamatória sistêmica no quadro clínico da sepse acarretam um maior risco de evolução clínica grave nesse cenário de pacientes.

Este estudo mostrou que os fatores maternos, entendidos como a rotura prolongada de membranas, o uso de antibiótico antenatal e a colonização por *Streptococcus agalactiae* do Grupo B não estiveram relacionados ao surgimento de sepse neonatal. Dentre os fatores neonatais identificados, os principais foram a prematuridade e o baixo peso. Com relação aos fatores nosocomiais, os procedimentos invasivos como o uso de cateterismos venoso central, a ventilação mecânica e o uso de nutrição parenteral estiveram associados à sepse neonatal. Baseado nestas informações, medidas de prevenção podem ser adotadas para minimizar estes fatores de risco e consequentemente a incidência de sepse neonatal tardia (Figura 6).

**Figura 6 - Diagrama de Interações na Sepse Neonatal.**



A possibilidade de aplicar à prática da Neonatologia os avanços no entendimento da influência dos genes sobre a resposta aos patógenos microbianos permanece uma das perspectivas mais estimulantes na genômica clínica.

Essa perspectiva é tanto mais atraente quanto uma série de estudos iniciais sugeriram a existência de fortes associações entre determinados polimorfismos genéticos e a susceptibilidade à sepse grave. Contudo, a análise da literatura mais recente indica que esses achados têm de ser revistos, à luz de trabalhos metodologicamente mais adequados.

Polimorfismos dos genes de citocinas permanecem um tema atraente para estudos de associação de genes candidatos, dado o importante papel das citocinas na patogênese da doença infecciosa. Contudo, os resultados já obtidos são frequentemente inconclusivos, tendo em vista as limitações dos estudos, tais como amostras pequenas e problemas com a estratificação da população, controles inadequados ou desenhos retrospectivos.

É fato que nosso próprio estudo apresentou algumas dessas limitações. A análise de amostra populacional pequena e de forma retrospectiva não gerou os resultados esperados, apesar de aspectos metodológicos positivos, como a análise de múltiplos polimorfismos (foram 6 SNPs), e de ter sido testado o desequilíbrio de ligação entre genes encontrados no mesmo cromossomo.

Talvez, a partir de um estudo prospectivo, com dados de pacientes não sobreviventes e uma maior população amostral, venha a ser possível uma melhor compreensão da relevância desses SNP na sepse neonatal.

Num futuro próximo, pacientes com doenças críticas, dentro de algumas horas após a admissão, poderão ser genotipados para melhor caracterizar a base genética da sua resposta inflamatória, e ter seu tratamento adaptado em conformidade. A utilidade desta abordagem depende criticamente de quais serão os genes marcadores examinados.

Infelizmente, até o presente momento, não existem fortes evidências de que os polimorfismos envolvidos na resposta inflamatória, dentre os avaliados neste trabalho, tanto no estudo dos pacientes ou na literatura (através da nossa revisão sistemática), sejam candidatos para triagem rotineira e de utilidade para o diagnóstico, definição terapêutica ou avaliação prognóstica na sepse neonatal.

Até que isso aconteça, os estudos para identificar genes de susceptibilidade a doenças ainda devem estar voltados para genes relevantes na patogenia, em populações etnicamente controladas e com o tamanho amostral adequado para permitir comparações múltiplas e mapeamento de múltiplos marcadores.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Percorremos um longo caminho para a compreensão subjacente à patogênese da sepse e choque séptico nas últimas 2 décadas, mas esta compreensão ainda não se traduziu em melhores resultados para nossos pacientes.

Possuímos um arsenal terapêutico com diferentes componentes e caminhos frente à resposta inflamatória, mas até agora, temos sido incapazes de identificar os subconjuntos de pacientes suscetíveis aos benefícios destas terapias.

Nossos fracassos não devem nos desencorajar, mas sim nos levar a uma mudança de paradigma. Acredito que o melhor entendimento dos componentes genéticos da resposta à sepse, em conjunto com um melhor entendimento da sua relevância funcional, embora atualmente uma tarefa árdua e formidável, permitirá a longo prazo identificar subconjuntos genotípicos de pacientes que possam se beneficiar de medidas preventivas e/ou terapêuticas para sepse e choque séptico.

Isto será, indubitavelmente, um meio de melhorar a atenção à saúde, especialmente necessário no cuidado de pacientes tão vulneráveis como os neonatos.

**REFERÊNCIAS**

---

**REFERÊNCIAS**

\* As referências seguem as normas propostas pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e da Mulher/IFF/FIOCRUZ

1. HORBAR JD et al., Trends in mortality for very low birth weight infants, 1991-1999. *Pediatrics*, 2002; 110:143-51.
2. LEONE CR et al., Brazilian Neonatal Research Network (BNRN): very-low birth weight (VLBW) infant morbidity and mortality. *Pediatr Res*. 2001; 49:405.
3. STOLL BJ et al., Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*, 2002; 110(2): 285-291
4. BARROS FC; VICTORA CG. Saúde materno-infantil em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil: principais conclusões das comparações de coortes de nascimento de 1982, 1993 e 2004. *Cad Saúde Pública*. 2008; 24(Suppl 3): S461-7.
5. DATASUS. Ministério da Saúde. Disponível em : <<http://tabnet.datasus.gov.br>  
<<http://svs.aids.gov.br/dashboard/mortalidade/atlas.show.mtw>>
6. MACAUBAS et al., Association between antenatal cytokine production and the development of atopy and asthma at age 6 years. *Lancet* 2003; 362:1192–1197.
7. Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat. *World Population Prospects: The 2004 Revision. Highlights* New York: United Nations ESA / P/WP.193, 24 Feb 2005.
8. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Evolução e Perspectivas da Mortalidade Infantil no Brasil - Rio de Janeiro; 1999.*
9. GARNER JS et al., CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control* 1988; 15: 128-40.
10. DAHMER MK et al., Genetic polymorphisms in sepsis. *Pediatr Crit Care*, 2005; 6 (3): S61-S73.
11. LIN Z, Pearson C, Chinchilli V et al. Polymorphisms of human SP-A, SP-B and SP-D genes: Association of SP-B Thr131Ile with ARDS. *Clin Genet* 2000; 58:181-191.
12. Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD). *Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil – 2003*. Disponível em: <[www.pnud.org.br/](http://www.pnud.org.br/)>

- 
13. Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD). Disponível em: <[www.pnud.org.br/](http://www.pnud.org.br/)>
  14. FUNDAÇÃO SEADE. Relatório Estadual de Acompanhamento: Objetivos e Desenvolvimento do Milênio do Estado de São Paulo. 2005. <[www.seade.gov.br/produtos/mmilenio/pdfs/01a.pdf](http://www.seade.gov.br/produtos/mmilenio/pdfs/01a.pdf)>
  15. Governo Federal. IPEA. Objetivos do desenvolvimento do Milênio. Relatório do Estado do Rio de Janeiro, 2011. <[www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/111003\\_relatorio\\_odmrj.pdf](http://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/111003_relatorio_odmrj.pdf)>
  16. SRIVASTAVA S.; SHETTY N. Healthcare-associated infections in neonatal units: lessons from contrasting worlds. *J Hosp Infect*, 2007; 65:292-306.
  17. KRAMER MS et al. The contribution of mild and moderate preterm birth to infant mortality. Fetal and Infant Health Study Group of the Canadian Perinatal Surveillance System. *JAMA*, 2000; 284: 843–849.
  18. BRACCI R. ; BUONOCORE G. Chorioamnionitis: a risk factor for fetal and neonatal morbidity. *Biol Neonate* 2003; 83:85–96.
  19. VIGNESWARAN R, Infection and preterm birth: evidence of a common causal relationship with bronchopulmonary dysplasia and cerebral palsy. *J Paediatr Child Health* 2000; 36:293–296.
  20. HERNÁNDEZ M E et al., análisis de episodios de sepsis en una unidad de cuidados intensivos neonatal. *Rev Panam Infectol* 2005; 7:22-8.
  21. Haque K N. Definitions of bloodstream infection in the newborn. *Pediatr Crit Care* 2005; 6(3 Suppl): S45-9.
  22. GOLDSTEIN et al. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005; 6: 2-7.
  23. STOLL BJ.et al. Early-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from national institute of child health and human development neonatal research network. *The Journal of Pediatrics*, 1996; 129(1): 72-80.
  24. FLIDEL-RIMON O. et al., Early enteral feeding and nosocomial sepsis in very low birth weight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004; 89: F289-92.
  25. BAHL R et al. Research priorities to reduce global mortality from newborn infections by 2015. *Pediatr Infect Dis J*. 2009; 28:S43-S48.
  26. SCHUCHAT A., Neonatal group B streptococcal disease screening and prevention. *N Engl J Med*. 2000 Jul 20;343(3):209-10.

- 
27. ANVISA. Critérios de Infecções Relacionados à Saúde . Neonatologia. Ministério da Saúde, 2008. 2a. versão 2010.
  28. LAWN JE.; COUSENS S, ZUPAN J. Four million neonatal deaths: when? Where? Why? *Lancet*. 2005;365:891-900.
  29. ZAIDI AK et al., Pathogens associated with sepsis in newborns and young infants in developing countries. *Pediatric Infection Disease Journal*, 2009; Jan;28 (1 Suppl):S10-8.
  30. ZAIDI AK et al., Hospital-acquired neonatal infections in developing countries. *Lancet*, 2005; 365:1175-1188
  31. GERDES, JS. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. *Clinics in Perinatology*, 1991,18 (2): 361-381; Parks, D. K. et al. Early-onset neonatal group B streptococcal infection: implications for practice. *Journal of Pediatric Health Care*, 2000; 14(6): 264-269.
  32. DONOWITZ, LG. Nosocomial infection in neonatal intensive care units. *American Journal of Infection Control*, 1989; 17(5):250-57.
  33. POLIN RA; SAIMAN L. Nosocomial infections in the neonate intensive care unit. *Neoreviews*, 2003; 4 (3): 81-88.
  34. BECK-SAGUE CM. et al., Bloodstream infections in neonatal intensive care unit patients: results of a multicenter study. *The Pediatric Infection Disease Journal*, 1994; 13 (12): 1110-1116.
  35. GREENOUGH A., Neonatal Infection. *Current Opinion in Pediatrics*, 1996; 8:6-10.
  36. HEEG P. Infecciones nosocomiales en neonatología y unidades de cuidado intensivo neonatales (UCIN). *International Federation of Infection Control* 2006; 2:85-7.
  37. THAVER D.; ZAIDI AK. Burden of neonatal infections in developing countries: a review of evidence from community-based studies. *Pediatric Infection Disease J.*, 2009 Jan;28 (1 Suppl):S3-9.
  38. PELTONIEMI O. Repeated antenatal corticosteroid treatment: a systematic review and meta-analysis. *ACTA Obstetricia et Gynecologica Scandinavica* 2011; 90: 719-727.
  39. VERMILLION ST, SOPER DE, CHASEDUNN-ROARK J. Neonatal sepsis after betamethasone administration to patients with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181:320-7.*Am J Obstet Gynecol* 1999; 181:320-7.

- 
40. RS.; LEONE CR. Programa de Atualização em Neonatologia (PRORN). Organizado pela Sociedade Brasileira de Pediatria. Editora Artmed Panamericana. Porto Alegre, 2004.
  41. GERDES J.S., Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. *Clinics in Perinatology*, 1991,18 (2): 361-381.
  42. SCHRAG et al., Early-Onset Neonatal Sepsis in the Era of Widespread Intrapartum Chemoprophylaxis *Pediatric Infectious Disease Journal*, 2006 ; Vol 25 - Issue 10 - pp 939-940.
  43. DARMSTADT GL et al. Infection control practices reduce nosocomial infections and mortality in preterm infants in Bangladesh. *J Perinatol* 2005;25:331-335.
  44. BALTIMORE R.S. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. *Clinics in Perinatology*, 2003; 18: 361-81.
  45. SCHULTZ et al., Enhanced IL-6 and IL-8 synthesis in term and preterm infants. *Pediatric Research*, 2002; 51:371-322.
  46. AKENZUA et al., Neutrophil and band counts in the diagnosis of neonatal infections. *Pediatrics*, 1974; 54:38-42.
  47. BARNER et al. Plasma levels of GCSF, IL-1,IL-6,IL-8, TNF alpha and ICAM in early onset neonatal sepsis. *Pediatric Research*, 1998; 44: 469-477.
  48. KUSTER et al., 1998 J. IL-1 receptor antagonist and IL-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. *Lancet*, 1998; 352:1271-1277.
  49. SHERMAN MP; GOETZMAN BW; AHLFORS CE. Tracheal aspiration and its clinical correlates in the diagnosis of congenital pneumonia. *Pediatr* 1980; 65:258-62.
  50. NG et al., Diagnostic markers of infection in neonates. *Archives of disease in Childhood Fetal and Neonatal*, 2004; ed 89: 229-23.
  51. MCCracken GJ; FREIJ B. Perinatal bacterial diseases. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, 1987 2 nd. WB Saunders Philadelphia 940-66.
  52. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. *MMWR Recomm Rep*. 2002; 51(RR-11):1-22.
  53. RODWELL RL; LESLIE AL; TUDEHOPE D. Early diagnosis of neonatal sepsis using hematologic score system. *The Journal of Pediatrics*,1988; 112: 761-767.

- 
54. KINGSMORE et al., Identification of diagnostic biomarkers for infection in premature neonates. American Society for Biochemistry and Molecular Biology 2008; 7:1863-1875.
  55. AVERY . Imunologia do feto e do recém nascido. 2010. 6 Ed. Cap 45; p 1042-1072.
  56. BAKER C J. Group B Streptococcal infection in newborns. *Pediatr Rev* 1979;64:5.
  57. MCCRACKEN GH; MIZE SG. A controlled study of intrathecal antibiotic therapy in gram negative enteric meningitis of infancy. *J Pediatr* 1976;89:66.
  58. POLIN RA. Role of fibronectin in diseases of newborn infants and children. *Rev Infect Dis* 1990; 12:428.
  59. STIEHM E.; FUDENBERG HH. Serum Levels of Immune Globulins in Health and Disease: A Survey. *Pediatrics* Vol. 37 No. 5 pp. 715-727, May 1966.
  60. LEVY MM, Biomarkers: diagnosis and risk assessment in sepsis. *Clinics in Chest Medicine* Dec, 2008; 29(4):591-603, vii.
  61. LEVY O et al., Impaired innate immunity in the newborn: newborn neutrophils are deficient in bactericidal/permeability-increasing protein. *Pediatrics*; 1999.104:1327-33.
  62. Levy MM et al., 2001 SCCM/ESIM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definition Conference. *Crit Care Med* 2003; 31 (4): 1250-1256.
  63. ANGELONE DF, *et al.* Innate Immunity of the Human Newborn Is Polarized Toward a High Ratio of IL-6/ TNF{alpha} Production In Vitro and In Vivo. *Pediatr. Res.* Jun 2006.
  64. CARTWRIGHT GE; ATHENS J W; WINTROBE MM. The Kinetics of granulopoiesis in normal man. *Blood* 1964; 24:780.
  65. ERDMAN SH et al. The supply and release of storage neutrophils: a developmental study. *Biol Neonate* 1982; 41:132.
  66. CHISTENSEN RD; HILL HR; ROTHSTEIN G. Granulocyte stem cell (CFUc) proliferation in experimental group B streptococcal sepsis. *Pediatr Res* 1983; 41:132.
  67. MARÓDI L. Impaired innate immune responses in human neonates. *Haematologica reports* 2006; 2(issue 10).Vth International Neonatal Hematology and Immunology Meeting, Brescia, Italy.

- 
68. TRACEY KJ ; CERAMI A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9: 317-343.
  69. ULLOA L; TRACEY KJ. The 'cytokine profile': a code for sepsis. *Trends in Molecular Medicine* 2005; 11(2): 56-63.
  70. TRACEY KJ; CERAMI A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* 1994; 45: 491-503.
  71. WINNING J et al., Molecular biology on the ICU. From understanding to treating sepsis. *Minerva Anesthesiol* 2006; 72: 255-267.
  72. RISCH NJ. Searching for genetic determinants in the new millenium. *Nature* 2000; 405:847–856 .
  73. COLLINS FS. Shattuck lecture: medical and societal consequences of the Human Genome Project. *N Engl J Med* 1999; 341:28–37.
  74. POCIOT F et al. No independent association between a tumor necrosis factor- $\alpha$  promotor region polymorphism and insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 1993; 23:3050–3053.
  75. MAJËTSCHAK M et al., Relation of a TNF Gene Polymorphism to Severe Sepsis in in Trauma Sepsis. *Ann Surg* 1999; 230 (2): 207-214.
  76. STÜBER F et al. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor- $\alpha$  concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1996; 24:381–384.
  77. TERRY CF, LOUKACI V, GREEN FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on Interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000; 275 (24): 18138-18144.
  78. WILSON AG et al, An allelic polymorphism within the humantumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8 and DR3 alleles. *J Exp Med* 1993; 177:557-560.
  79. BERNARD GR et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001; 344:699–709.
  80. LOUIS E et al., Tumor necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF- $\alpha$  production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 401-406.
  81. QUASNEY MW et al., Increased frequency of the tumor necrosis factor- $\alpha$ -308 A allele in adults with human immunodeficiency virus dementia. *Ann Neuro* 2001; 50: 157-162.

- 
82. MC GUIRE W et al., Variations in the TNF- $\alpha$  promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994; 371: 508-510.
  83. NADEL S et al., Variation in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease. *J Infect Dis* 1996; 174:878-880.
  84. WATERER GW; WUNDERINK RG. Genetic susceptibility to pneumonia. *Clin Chest Med* 2005; 26: 29-38.
  85. HEDBERG CL et al., Tumor necrosis factor alpha -308 polymorphism associated with increased sepsis mortality in ventilated very low birth weight infants. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23 (5): 424-428.
  86. WEITKAMP JH; STÜBER F; BARTMANN P. Pilot study assessing TNF gene polymorphism as a prognostic marker for disease progression in neonates with sepsis. *Infection*. 2000 Mar-Apr;28(2):92-6.
  87. SCHÜLLER AC et al., Prevalence of two tumor necrosis factor gene polymorphisms in premature infants with early onset sepsis. *Biol Neonate*. 2006;90(4):229-32.
  88. READ RC et al.: An interleukin-1 genotype is associated with fatal outcome of meningococcal disease. *J Infect Dis* 2000; 182:1557-1560.
  89. BALDING J et al., Genomic polymorphic profiles in an irish population with meningococcaemia: is it possible to predict severity and outcome of disease? *Genes Immun* 2003; 4: 533-540.
  90. SIPAHI T; POCAN H; AKAR N. Effect of various genetic polymorphisms on the incidence and outcome of severe sepsis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2006; 12 (1): 47-54.
  91. TEÜFFEL O et al., Association between tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter -308 A/G polymorphism and susceptibility to sepsis and sepsis mortality: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* 2009; 38 (1):276-282.
  92. HÄRTEL C et al., German Neonatal Network. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter -308 G/A polymorphism and susceptibility to sepsis in very low birth weight infants. *Crit Care Med*.2011 May;39(5):1190-5.
  93. WUNDERINK R; WATERER G. Genetics of sepsis and pneumonia. *Curr Op Crit Care* 2003, 9:384-389.
  94. MESSER G et al., Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-  $\beta$  gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-  $\beta$  production. *J Exp Med* 1991; 173:209–219.

- 
95. TIANCHA H et al., Association between lymphotoxin-  $\alpha$  intron + 252 polymorphism and sepsis: A meta-analysis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2011; 43: 436–447.
  96. CORDELL HJ; CLAYTON DG. Genetic association studies. *Lancet* 2005; 366:1121 – 31.
  97. TEMPLE SE et al., Polymorphisms in lymphotoxin alpha and CD14 genes influence TNF alpha production induced by Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Genes Immun* 2003; 4:283-8.
  98. DINARELLO CA; WOLFF SM. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* 1993; 328:106–113.
  99. DINARELLO CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997;112: 321S–329S.
  100. AREND WP et al., Interleukin-1 receptor antagonist: Role in biology. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:27–55.
  101. VAN DEUREN M et al., The pattern of interleukin-1beta (IL-1beta) and its modulating agents IL-1 receptor antagonist and IL-1 soluble receptor type II in acute meningococcal infections. *Blood* 1997; 90:1101–1108.
  102. FANG XM et al. Comparison of two polymorphisms of the interleukin-1 gene family: interleukin-1 receptor antagonist polymorphism contributes to susceptibility to severe sepsis. *Crit Care Med* 1999; 27:1330–1334.
  103. VAN DER POLL T; VAN DEVENTER SJ. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 1999; 13:413– 426.
  104. PRESTERL E et al., Cytokine profile and correlation to the APACHE III and MPM II scores in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:825–832.
  105. HACK CE et al: Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood* 1989; 74:1704–1710.
  106. SCHLÜTER B et al., Interleukin 6-a potential mediator of lethal sepsis after major thermal trauma: Evidence for increased IL-6 production by peripheral blood mononuclear cells. *J Trauma* 1991; 31:1663–1670.
  107. SCHLÜTER B et al: Effect of the interleukin-6 promoter polymorphism- 174 G/Co n the incidence and outcome of sepsis. *Crit Care Med* 2002; 30:32–37.
  108. FISCHMAN D et al., The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene in IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102:1369–1376.

- 
109. KILPINEN S, et al: The promoter polymorphism of the interleukin-6 gene regulates interleukin-6 production in neonates but not in adults. *Eur Cytokine Netw.* 2001; 12:62–68.
  110. HARDING D, et al: Is Interleukin-1–174 genotype associated with the development of septicemia in preterm infants? *Pediatrics* 2003; 112:800–803.
  111. WALLEY KR, et al: Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun* 1996; 64:4733–4738.
  112. VAN DER POLL T; MAECHANT A; VAN DEVENTER S. The role of interleukin-10 in the pathogenesis of bacterial infection. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3:605–607.
  113. DE WAAL MALEFYT R, et al: Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174:1209–1220.
  114. MOORE KW et al., Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683–765.
  115. HOWARD M et al., Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med* 1993; 177: 1205–1208.
  116. GERARD C et al., Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J Exp Med* 1993; 177:547–550.
  117. STEINHAUSER ML et al., IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J Immunol* 1999; 162:392–399.
  118. VAN DER POLL T et al., Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 1996; 174:994–1000.
  119. ESKADALE J et al., Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics* 1997; 26:120–128.
  120. TURNER DM et al., An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24:1–8
  121. LAZARUS M et al: Genetic variation in the interleukin10 gene promoter and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1997; 24:2314–2317.
  122. GLYNN P et al., Circulating interleukin 6 and interleukin 10 in community acquired pneumonia. *Thorax* 1999; 54:512–555.
  123. GALLAGHER PM et al. Association of IL-10 polymorphism with severity of illness in community-acquired pneumonia. *Thorax* 2003; 58: 154-156.

- 
124. SCHAAF BM et al., Pneumococcal septic shock is associated with the interleukin-10-1082 gene promoter polymorphism. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168 (4): 476-480.
  125. LOWE PR et al., Influence of interleukin-10 polymorphisms on interleukin-10 expression and survival in critically ill patients. *Crit Care Med* 2003; 31:34–38.
  126. REID CL et al., Genetic variation in proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 2002; 30:2216–2221.
  127. UNKELBACK K et al., A new promoter polymorphism in the gene of lipopolysaccharide receptor CD14 is associated with expired myocardial infarction in patients with low atherosclerotic risk profile. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 9:932–938.
  128. BALDINI M et al., A polymorphism in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:976–983.
  129. HUBACEK JA et al., C(-260) to T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation* 1999; 99:3218–3220.
  130. LEVAN TD et al., A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *J Immunol* 2001; 167: 5834–5844.
  131. KOENIG W et al., CD14 C (-260) –T polymorphism, plasma levels of the soluble endotoxin receptor CD14, their association with chronic infections and risk of stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:43–42.
  132. GIBOT S et al., Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate. *Crit Care Med* 2002; 30:969–97.
  133. HEESSEN M et al., The -260C to T promoter polymorphism of the lipopolysaccharide receptor CD14 and severe sepsis in trauma patients. *Intens Care Med* 2002; 28:1161–1163.
  134. HUBACEK JA et al., The common functional C (-159)T polymorphism within the promoter region of the lipopolysaccharide receptor CD14 is not associated with sepsis development or mortality. *Genes Immun* 2001; 1:405–407.
  135. CAMBIEN F et al. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: The Nancy study. *Am J Hum Genet* 1988; 43:774–780.
  136. RIGAT B et al., An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-

- 
- converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86:1343–1346.
137. TIRET L et al., Evidence from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 1992; 51:197–205.
138. COSTEROUSSE O et al., Angiotensin I converting enzyme in human circulating mononuclear cells: Genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem J* 1993; 290:33–40.
139. SPRUTH E et al., Expression of ACE mRNA in the human atrial myocardium is not dependent on left ventricular function, ACE inhibitor therapy, or the ACE I/D genotype. *J Mol Med* 1999; 77:804–810.
140. ROSATTO N et al., Intron 16 insertion of the angiotensin converting enzyme gene and transcriptional regulation. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14:868–871.
141. SUEHIRO T et al., Increased amount of the angiotensin-converting enzyme (ACE) mRNA originating from the ACE allele with deletion. *Hum Genet* 2004; 115:91–96.
142. HARDING D et al. Severity of meningococcal disease in children and the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1103–1106.
143. YANAMANDRA K; LOGGINS J; BAIER RJ. The Angiotensin Converting Enzyme Insertion/Deletion polymorphism is not associated with an increased risk of death or bronchopulmonary dysplasia in ventilated very low birth weight infants. *BMC Pediatr* 2004; 4:26.
144. MARSHALL RP et al., Angiotensin converting enzyme insertion/ deletion polymorphism is associated with susceptibility and outcome in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:646–650.
145. AIRD WC. Vascular bed-specific hemostasis: Role of endothelium in sepsis pathogenesis. *Crit Care Med* 2001; 29:S28–S35.
146. PARAMO JA et al., Types 1 and 2 plasminogen activator inhibitor and tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis. *Thromb Haemost* 1990; 64:3–6.
147. BRANDTZAEG P et al., Plasminogen activator inhibitor 1 and 2, alpha-2-antiplasmin, plasminogen, and endotoxin levels in systemic meningococcal disease. *Thromb Res* 1990; 57:271–278.
148. ERIKSSON P et al., Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:851–1855.

- 
149. HERMANS PW et al., 4G/5G promoter polymorphism in the plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and outcome of meningococcal disease. *Lancet* 1999; 354:556–560.
  150. WESTENDORP RG; HOTTENGA JJ; SLAGBOOM PE. Variation in plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and risk of meningococcal septic shock. *Lancet* 1999; 354:561–563.
  151. MENGES T et al., Plasminogen-activator-inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism and prognosis of severely injured patients. *Lancet* 2001; 357: 1096–1097.
  152. TURNER MW: Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease. *Immunobiology* 1998; 199:327–339.
  153. KUHLMAN M; JOINER K; EZEKOWITZ RA: The human mannose-binding protein functions as an opsonin. *J Exp Med* 1989; 169: 1733–1745.
  154. MATSUSHITA M, ENDO Y, FUJITA T. MASP1 (MBL-associated serine protease 1). *Immunobiology* 1998; 199:340–347.
  155. SUMMERFIELD JA et al., Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet* 1995; 345:886–889.
  156. SUMIYA M et al., Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet* 1991; 337: 1569–1570.
  157. LIPSCOMBE RJ et al., High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet* 1992; 1:709–715.
  158. SUMMERFIELD JA et al., Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. *BMJ* 1997; 314:1229–1232.
  159. KOCH A et al. Acute respiratory tract infections and mannose binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA* 2001; 285:1316–1321.
  160. HIBBERD ML et al: Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. *Lancet* 1999; 353:1049–1053.
  161. GARRED P et al: Mannose-binding lectin polymorphisms and susceptibility to infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999; 42:2145–2152.
  162. GOMI K et al: Mannose- binding lectin gene polymorphism is a modulating factor in repeated respiratory infections. *Chest* 2004;126; 95-99.

- 
163. ISRAËELIS J et al., Mannose-binding lectin and infection risk in newborns: a systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2010 Nov; 95(6): F452-61. Epub 2010 May 20. Review.
  164. SPRINGER TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346: 425-34.
  165. BEVILACQUA MP. Endothelial-leucocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 767-804.
  166. KANSAS GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996; 88: 3259-87.
  167. WENZEL K et al. Functional characterization of atherosclerosis-associated Ser128Arg and Leu554Phe E-selectin mutations. *Biol Chem* 1999; 380: 661-7.
  168. YOSHIDA M et al., E-selectin polymorphism associated with myocardial infarction causes enhanced leukocyte-endothelial interactions under flow conditions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 783-8.
  169. JILMA B et al., The single nucleotide polymorphism Ser128Arg in the E-selectin gene is associated with enhanced coagulation during human endotoxemia. *Blood* 2005; 105: 2380-3.
  170. GHILARDI G et al., Ser128Arg gene polymorphism for E-selectin and severity of atherosclerotic arterial disease. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2004; 45: 143-7.
  171. BARBAUX SC et al. Association between P-selectin gene polymorphism and soluble P-selectin levels and their relation to coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1668-73.
  172. HERRMANN SM et al. The P-selectin gene is highly polymorphic: reduced frequency of the Pro715 allele carriers in patients with myocardial infarction. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1277-84.
  173. WATERLAND RA; MIICHELS KB. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annu Rev Nutr.* 2007; 27:363-88.
  174. CUPPLES LA et al. The Framingham Heart Study 100K SNP genome-wide association study resource: overview of 17 phenotype working group reports. *BMC Med Genet.* 2007;8(1): S1.
  175. MOREIRA-FILHO CA. A investigação genômica pediátrica no Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP. *Rev Med (São Paulo).* 2010 abr.-jun.; 89(2): 83-7.
  176. COHEN J. Genomics. DNA duplications and deletions help determine health. *Science.* 2007; 317(5843): 1315-7.

- 
177. DALTON WS, FRIEND SH. Cancer biomarkers an invitation to the table. *Science*. 2006; 312(5777): 1165-8.
  178. RIBEIRO KB; LOPES LF; DE CAMARGO B. Trends in child- hood leukemia mortality in Brazil and correlation with social inequalities. *Cancer*. 2007; 110(8): 1823-31.
  179. HARDING D. Impact of common genetic variation on neonatal disease and outcome. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2007; 92:F408–F413.
  180. BOGARDUS ST Jr.; CONCATO J; FEINSTEIN AR. Clinical epidemiological quality in molecular genetic research: the need for methodological standards. *JAMA*, 1999; 281:1919–1926.
  181. CLARK M.F; BAUDOUIIN S.V, A systematic review of the quality of genetic association studies in human sepsis. *Intensive Care Med* (2006) 32:1706–1712.
  182. AYDEMIR C et al., Mannose-binding lectin codon 54 gene polymorphism in relation to risk of nosocomial invasive fungal infection in preterm neonates in the neonatal intensive care unit. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011 Sep; 24(9): 1124-7.
  183. ABU-MAZIAD et al., Role of polymorphic variants as genetic modulators of infection in neonatal sepsis. *Pediatr Res*. 2010 Oct; 68(4): 323-9.
  184. KOROGLU OA et al., Mannose-binding lectin gene polymorphism and early neonatal outcome in preterm infants. *Neonatology*. 2010; 98(4): 305-12.
  185. SPIEGLER J et al., Polymorphisms in the Renin-Angiotensin system and outcome of very-low-birth weight infants. *Neonatology*. 2010;97(1):10-4.
  186. BERTALAN R et al., Association between birth weight in preterm neonates and the BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008 Jul; 111(1-2): 91-4. Epub 2008 May 27.
  187. REIMAN M et al.; PIPARI Study Group. Interleukin-6 polymorphism is associated with chorioamnionitis and neonatal infections in preterm infants. *J Pediatr*. 2008 Jul;153(1):19-24. Epub2008 Apr 3. PubMed PMID: 1857152.
  188. DZWONEK AB et al., The role of mannose-binding lectin in susceptibility to infection in preterm neonates. *Pediatr Res*. 2008. Jun;63(6):680-5.
  189. VAN DER ZWET WC et al., Mannose-binding lectin (MBL) genotype in relation to risk of nosocomial infection in pre-term neonates in the neonatal intensive care unit. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Feb; 14(2): 130-5. Epub 2007 Nov 21.
  190. DERZBACH L et al, Selectin polymorphisms and perinatal morbidity in low-birth weight infants. *Acta Paediatr*. 2006 Oct; 95(10): 1213-7.

- 
191. HÄRTEL et al., Genetic polymorphisms of hemostasis genes and primary outcome of very low birth weight infants. *Pediatrics*. 2006 Aug; 118(2):683-9.
  192. BAIER RJ, LOGGINS J, YANAMANDRA K. IL-10, IL-6 and CD14 polymorphisms and sepsis outcome in ventilated very low birth weight infants. *BMC Med*. 2006 Apr12; 4:10.
  193. SZE BENI et al., Genetic polymorphisms of CD14, toll-like receptor 4, and caspase-recruitment domain 15 are not associated with necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*.2006 Jan; 42(1): 27-31.
  194. GÖPEL W et al., Interleukin-6-174-genotype,sepsis and cerebral injury in very low birth weight infants. *Genes Immun*. 2006Jan; 7(1): 65-8.
  195. BAIER R; LOGGINS J; YANAMANDRA K. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism does not alter sepsis outcome in ventilated very low birth weight infants. *J Perinatol*. 2005 Mar;25(3):205-9.
  196. AHRENS P et al. Mutations of genes involved in the innate immune system as predictors of sepsis in very low birth weight infants. *Pediatr Res*. 2004 Apr;55(4):652-6. Epub 2004 Jan 22.
  197. BESSLER H, OSOVSKY M, SIROTA L. Association between IL-1ra gene polymorphism and premature delivery. *Biol Neonate*. 2004;85(3):179-83.
  198. TREZL A et al., Genetic variants of TNF-[FC12]a, IL-1beta, IL-4 receptor [FC12]a-chain, IL-6 and IL-10 genes are not risk factors for sepsis in low-birth-weight infants. *Biol Neonate*. 2003;83(4):241-5.
  199. AURITI C et al., Role of mannose-binding lectin in nosocomial sepsis in critically ill neonates. *Hum Immunol*. 2010 Nov; 71(11): 1084-8.
  200. DEL VECCHIO A et al., The role of molecular genetics in the pathogenesis and diagnosis of neonatal sepsis. *ClinPerinatol*. 2004 Mar; 31(1): 53-67. Review.
  201. HÄRTEL et al., 159C>T CD14 genotype--functional effects on innate immune responses in term neonates. *Hum Immunol*. 2008 Jun; 69(6):338-43.
  202. CHAUHAN M; MCGUIRE W. Interleukin-6 (-174C) polymorphism and the risk of sepsis in very low birth weight infants: meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2008 Nov; 93(6):F427-9. Epub 2008 Mar 28. Review.
  203. KLEIN J.O.; MARCY S.M. Bacterial sepsis and meningitis. In: Remington J.S.; Klein L, J.O. (Ed.). *Infections diseases of the fetus an newborn infant*. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. p. 835-890

- 
204. OBERHOLZER A; OBERHOLZER C; MOLDAWER LL. Sepsis Syndromes: Understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock* 2001; 16 (2): 83-96.
  205. SCHÖDER et al: Gender differences in sepsis: Genetically determined? *Shock* 2000; 14 (3): 307-313.
  206. WATANABE E et al., Association between lymphotoxin-alpha (tumor necrosis-beta) intron polymorphism and predisposition to severe sepsis is modified by gender and age. *Crit Care Med* 2010; 38 (2): 181-193.
  207. NAGATA E. et al. Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit: incidence and risk factors. *Am. J. Infect. Control*, 2002: v. 30, n. 1, p. 26-30.
  208. CALIL; VALDENISE MLT; Caracterização do Recém-Nascido Pré-Termo-Assistência Integrada ao Recém-Nascido. Leone, Cléa Rodrigues; Ateneu, São Paulo, 2001.
  209. LU MC; HALFON N. Racial and ethnic disparities in birth outcomes: a life-course perspective. *Maternal and Child Health Journal* 2003; 7(1): 13-30.
  210. ALEXANDER GR et al., US birth weight/gestational age-specific neonatal mortality: 1995-1997 rates for whites, hispanics, and blacks. *Pediatrics* 2003; 111(1):61-66.
  211. FISCELLA K. Racial disparity in infant and maternal mortality: confluence of infection, and microvascular dysfunction. *Maternal and Child Health Journal* 2004;8(2): 45-54.
  212. ROSENTHAL N, SCHWARTZ RS. In search of perverse polymorphisms. *N Engl J Med* 1998; 338:122–124.
  213. MYLES S et al., Worldwide population differentiation at disease-associated SNPs. *BMC Medical Genomics* 2008; 1: 22-32.
  214. MATTEI J et al., Disparities in allele frequencies and population differentiation for 101 disease-associated single nucleotide polymorphisms between Puerto Ricans and non-Hispanic whites. *BMC Genetics* 2009; 10: 45.57.
  215. PEMBERTOM TJ et al., Prevalence of common-disease variants in Asian Indians. *BMC Genetics* 2008; 9: 13-33.
  216. IOANNIDIS JPA; NTZANI EE; TRIKALINOS TA. ‘Racial’ differences in genetic effects for complex diseases. *Nature Genetics* 2004; 36 (12): 1312-1318.
  217. SPIELMAN RS et al., Common genetic variants account for differences in gene expression among ethnic groups. *Nature Genetics* 2007; 39(2): 226-231.

- 
218. GODDARD KAB et al., Linkage disequilibrium and allele-frequency distributions for 114 single-nucleotide polymorphisms in five populations. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 216-234.
219. HOFFMANN SC et al., Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution. *Am J Transplant* 2002; 2(6): 560-567.
220. PENNA-COSTA et al. Brasil.MS. Secretaria de Vigilância em Saúde: 20 anos de SUS no Brasil, 2009.  
Disponível em : <[www.portal.saude.gov.br/portal/.../pdf/saude\\_brasil\\_2](http://www.portal.saude.gov.br/portal/.../pdf/saude_brasil_2)>
221. MALVEIRA SS. et al. Infecção hospitalar bacteriana em um grupo de recém-nascidos portadores de cardiopatia congênita, internados em uma unidade neonatal pública Belém---Pará. In: Congresso Brasileiro de Neonatologia, 8., 2004, São Paulo. Anais ... São Paulo: Sociedade Brasileira de Pediatria, 2004. p. 238.
222. MESQUITA M.; HERNAEZ M. Infecciones nosocomiales em el neonato: índice de incidência y factores de risco. *Pediatría, Assuncion*, v. 30, n. 1, p. 28-28, 2003.
223. STOLL BJ et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human development Neonatal Research Network. *J Pediatr* 1996; 129:63-71.
224. GRAHAM PL 3<sup>rd</sup> et al., Risk Factors for late onset gram- negative sepsis in low birth weight infants hospitalized in the neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25:113-7.
225. NEWMAN; CHRISTOPHER D. Catheter-Related Blood- stream Infections in the Pediatric Intensive Care Unit. *Semn Pediatr Infect Dis* 2006;17:20-4.
226. FRANCESCHI DSA, et al., Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. *Int J Infect Dis* 2009;13 (4): 493-498.
227. WEBER MW et al. Predictors of neonatal sepsis in developing countries. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:711-7.
228. SANTOS AR et al., Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* 2002; 186 (11): 1687-1691.
229. VISENTAINER JEL et al., TNF, IFNG, IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in south and southeast Brazil. *Int J Immunogenet* 2008; 35 (4-5): 287-293.

- 
230. ROXO VMMS et al., Polymorphisms within the tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genes and endemic pemphigus foliaceus – are there any associations? *Tissue Antigens* 2003; 62 (5): 394-400.
  231. HOSKING L et al., Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *Eur J Hum Genet* 2004; 12 (5): 395-399.
  232. PRITCHARD JK; ROSENBERG NA. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am J Hum Genet* 1999; 65:220–8.