



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde

Michelle Virgínia Eidt

Atividade do inflamassoma em pacientes com sepse grave e choque séptico

Porto Alegre
Fevereiro, 2015

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde

Atividade do inflamassoma em pacientes com sepse grave e choque séptico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina e Ciências da Saúde.

MICHELLE VIRGÍNIA EIDT

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Porto Alegre, 2015

*"A sabedoria dos homens é
proporcional não à sua
experiência, mas à sua
capacidade de adquirir
experiência"*

George Bernard Shaw

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira pela oportunidade de ser por ele guiado na arte do mundo acadêmico, permitindo a realização e concretização deste feito.

Agradeço ao apoio, compreensão e amor do meu esposo Loro e meu filho Léo, pelas difíceis horas de ausência e pela iluminação de cada sorriso de apoio. Amor incondicional.

Agradeço também aos meus pais, pela persistência em me apoiar nos meus sonhos e pela educação que tive. Às minhas irmãs, pela paciência e conselhos.

Aos meus sogros, pela dedicação, amor e cuidado com a nossa família, sempre disponíveis para ajudar e aconselhar.

Aos meus colegas de laboratório e pesquisa, acadêmicos e doutorandos, sem vocês nada disso seria possível.

Aos grandes amigos e professores Denizar Alberto da Silva Melo e Márcio Vinícius Fagundes Donadio, por sua competência com os números e o amor à pesquisa, com o apoio nas análises estatísticas e interpretação de resultados.

Sem cada um de vocês, nada disso seria possível.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	6
Resumo.....	8
Abstract.....	9
Capítulo 1.....	10
1. Introdução.....	11
1.1 Definição.....	11
1.2 Epidemiologia.....	13
1.3 Resposta do organismo à infecção na sepse.....	14
1.4 O Inflamasoma.....	14
2. Justificativa.....	16
3. Objetivos.....	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
Capítulo 2 - Artigo científico.....	18
Capítulo 3 - Considerações finais.....	38
Referências Bibliográficas.....	41
APÊNDICE A - CCMA Information for authors	44
ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	46

LISTA DE ABREVIATURAS

APACHE II - Acute Physiology and Chronic Health Disease Classification System II

DMOS - Disfunção de múltiplos órgãos e sistemas

FiO₂ - Fração Inspirada de Oxigênio

HIV - Vírus da imunodeficiência adquirida

IL-1 β - Interleucina 1 Beta

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IL-10 - Interleucina 10

IL-18 - Interleucina 18

KTTP - Tempo de tromboplastina ativada

LPS - Lipopolissacarídeo

NO - Óxido Nitrico

PAM - Pressão arterial média

PAO₂ - Pressão alveolar de oxigênio

PAS - Pressão arterial sistólica

RNA - Ácido ribonucleico

RNI - Índice internacional normalizado da via extrínseca da coagulação

SIRS - Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

SOFA – Sepsis related organ failure assessment

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

UTI - Unidade de terapia intensiva

RESUMO

A sepse permanece sendo a principal causa de morte em UTI, podendo expressar índices de até 80% de mortalidade. Apesar de sua importância e a demanda de recursos, seu reconhecimento precoce ainda é um desafio, deixando margem para a ocorrência de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (DMOS), choque e desfechos fatais. Estudos recentes vem apresentando teorias sobre o mecanismo fisiopatológico da sepse, na busca por novas alternativas terapêuticas. O principal responsável pela gravidade da sepse é a resposta inflamatória sistêmica, representada pela secreção de citocinas inflamatórias. Uma importante etapa do processo inflamatório é a atividade do inflamassoma, o qual funciona através da ativação da Caspase-1, permitindo a liberação de formas ativas das interleucinas IL-1 β e IL-18, sinalizando o início da resposta do sistema imune inato. Sendo assim o inflamassoma vem sendo amplamente estudado. Nosso estudo tem como objetivo avaliar se nas diferentes gravidades da sepse a atividade do inflamassoma (medida pelos níveis de IL-1 β e IL-18 no plasma) tem expressão diferente entre os grupos, e sua relação com a mortalidade. Os resultados demonstraram que a atividade do inflamassoma com o aumento dos níveis séricos de IL-18 pode ser o responsável pelo alto índice de mortalidade na sepse, independente do nível de IL-1 β , apesar do processo de ativação e via de expressão ser simultânea e a mesma. Portanto, nossas descobertas podem auxiliar na compreensão dos eventos inflamatórios que levam a sepse, podendo influenciar na investigação de terapêuticas futuras e na redução de mortalidade.

Palavras chave: Inflamossomo, IL-1 β ; IL-18; sepse; biomarcadores; mortalidade.

ABSTRACT

Sepsis remains the leading cause of death in the ICU and can express rates of up to 80% mortality. Despite the importance and demand for resources, the early recognition is still a challenge, allowing the occurrence of multiple organ dysfunction syndromes (MODS), shock and fatal outcomes. Recent research has shown theories about the pathophysiological mechanism of sepsis in the search for new therapies. The principal responsible for sepsis severity is inflammatory response, represented by the secretion of inflammatory cytokines. An important step in the inflammatory process is the activity of inflammasome, which functions through the activation of Caspase-1, allowing the release of active forms of interleukins IL-1 β and IL-18, signaling the beginning of the response of the innate immune system. Therefore the inflammasome has been widely studied. Our study aims to assess whether the different severity of sepsis inflammasome activity (measured by levels of IL-1 β and IL-18 in plasma) have different expression between groups, and their relationship with mortality. The results showed that the activity of inflammasome with increased serum levels of IL-18 may be responsible for high mortality in sepsis, independent of the level of IL-1 β , although the activation process and route of expression be simultaneous and same. Therefore, our findings may help to understand the inflammatory events that lead to sepsis, which may influence the future therapeutic and research in reducing mortality.

Keywords: Inflammasome, IL-1 β ; IL-18; sepsis; biomarkers; mortality.

Capítulo 1

Introdução

Justificativa

Objetivos

1. INTRODUÇÃO

1.1 Definição

Sepse é a denominação dada ao processo de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) decorrente de uma infecção. Conforme o consenso internacional de sepse, esta é definida como a associação de sinais e sintomas inflamatórios com infecção presente ou presumida, seguindo classificações conforme sua evolução e gravidade. Em 2010, Boechat publicou na Revista Brasileira de Clínica Médica o artigo intitulado *Sepsis: diagnosis and treatment*, resumindo as diferentes definições para estágio da mesma doença (Tabela 1)¹

Tabela 1 – Sepse – definições e diagnósticos

Infecção	Processo patológico causado pela presença de tecido previamente estéril por microrganismos patogênicos.
SIRS	Temperatura > 38°C ou < 36°C Frequência cardíaca > 90 bpm Frequência respiratória > 20 irpm Leucocitose (leucócitos > 12.000 ou < 4.000)
Sepse	Síndrome clínica definida pela presença de infecção e SIRS
Sepse grave	Sepse complicada com uma ou mais disfunções orgânicas
Choque séptico	Sepse associada à hipotensão refratária a volume adequada

SIRS = síndrome de resposta inflamatória sistêmica

*Boechat, A. L.; et al. Sepsis: diagnosis and treatment. Rev Bras Clin Med, 2010.

Quando considerada a evolução da sepse, de acordo com a gravidade do quadro, nos deparamos com três fases distintas, compreendendo a sepse propriamente dita, a disfunção orgânica e o choque. Conforme o *International Sepsis Definitions Conference de 2003*², foram estabelecidos critérios restritos para a certificação diagnóstica de cada etapa, por meio da reunião entre os maiores especialistas da área, auxiliando no diagnóstico diferencial (Tabela 2).

Tabela 2

Critérios diagnósticos de sepse

Infecção documentada ou suspeita, associado a dois dos critérios abaixo:

Febre (>38,3°C)

Hipotermia (temperatura <36°C)

Frequência cardíaca > 90 bpm ou > 2x o valor normal para a idade

Taquipnéia (FR >20)

Alteração do estado mental

Anasarca ou balanço hídrico positivo > 20 ml/kg por 24h

Hiperglicemia (glicemia >140 mg/dl) na ausência de diabetes

Sepse Grave (Severa)

Sepse induzindo hipotensão (PAS<90mmHg ou PAM<65mmHg)

Lactatemia em valor acima da referência

Débito urinário <0,5 ml/kg/h por 2h, apesar da ressuscitação volêmica

Hipoxemia arterial (PaO₂/FiO₂ <300)

Creatinina > 2mg/dl ou > 0,5 mg/dl do valor basal

Trombocitopenia (Plaquetas < 100.000)

Alteração de coagulação (RNI> 1,5)

Hiperbilirrubinemia (bilirrubina plasmática total> 4 mg/dl)

Glasgow 14 – estado confusional

Choque Séptico

Falência circulatória aguda (hipotensão persistente sem outra causa definida), apesar da ressuscitação volêmica adequada, considerando um ou mais dos critérios abaixo:

PAS<90 mmHg

PAM<60 mmHg

Redução da PAS em 40 mmHg (comparando com a PAS basal)

BPM: batidas por minuto; DP: desvio padrão; PAS: pressão arterial sistólica; PAM: pressão arterial média; mmHg: milímetros de mercúrio, PaO₂: pressão parcial de oxigênio; FiO₂: fração inspirada de oxigênio; INR: razão normalizada internacional; TTPA: tempo de tromboplastina parcial ativada.

* Adaptado *Sepsis Definitions Conference, 2003*

A sepse grave se caracteriza como o quadro séptico somado à disfunção orgânica, conforme discriminado na tabela acima. Quando nos deparamos com um choque séptico, temos por definição a falência circulatória aguda com hipotensão arterial persistente, apesar de instituídas medidas de reposição volêmica, sendo necessário o uso de drogas vasopressoras para a manutenção dos parâmetros hemodinâmicos do paciente.

1.2 Epidemiologia

A sepse permanece sendo a principal causa de morte em UTI, podendo expressar índices de até 80% de mortalidade. Apesar de sua importância e a demanda de recursos, seu reconhecimento precoce ainda é um desafio, deixando margem para a ocorrência de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (DMOS), choque e desfechos fatais.

Sabemos que a sepse atinge cerca de 18 milhões de pessoas por ano no mundo. Conforme estudo epidemiológico norte americano, a incidência da sepse aumentou de 82,7 para 240,4/100 mil habitantes, bem como as mortes relacionadas a ela, ainda que a taxa de mortalidade geral entre os pacientes com sepse tenha sido reduzida nesse período³.

Em estudo epidemiológico multicêntrico recente sobre sepse, com dados brasileiros, abrangendo os 65 maiores hospitais do país, a mortalidade nos subgrupos sepse, sepse grave e choque séptico foram de 16,7%, 34,4% e 65,3%, respectivamente⁴, sendo estes dados compatíveis com estatísticas americanas. Sendo assim, sua incidência persiste em crescimento e sua mortalidade permanece longe do aceitável, apesar dos avanços de seu diagnóstico e tratamento.

1.3 Resposta do organismo à infecção na sepse

A infecção resulta inicialmente na estimulação do sistema imune inato mediada por células inflamatórias, como monócitos, macrófagos e linfócitos⁵. Essas

células estão permanentemente em estado não ativado, e quando em contato com patógenos seus produtos geram uma resposta inflamatória sistêmica intensa. Essa tentativa de defesa do corpo no combate à infecção contribui para o desenvolvimento de lesões orgânicas⁶.

A sepse tem por característica a resposta exacerbada do sistema imune em decorrência de uma infecção, havendo a liberação excessiva de mediadores inflamatórios. A evolução para a disfunção orgânica, denominada sepse grave, tem a resposta imune e a disfunção do metabolismo celular como chaves do processo⁷. Cascatas inflamatórias e liberação de citocinas parecem ser as principais causas da lesão de órgãos na sepse, devido à promoção de vasodilatação para a migração de mediadores inflamatórios produzidos e células de defesa, podendo levar ao dano celular e morte⁷.

1.4 O Inflamasoma

Um importante mecanismo da fisiopatologia da sepse parece ser a ativação da Caspase 1, metabolizando formas pró-inflamatórias em citocinas ativas⁸. A ativação dessa pró-forma se dá por meio do Inflamasoma, que permite a liberação de Interleucinas ativas do tipo IL-1 β e IL-18. Estas são a primeira linha de defesa celular na sepse, responsáveis pela perpetuação da inflamação e na resposta das células de defesa⁹. Entretanto, a exacerbção da resposta imune provoca a lesão celular, evoluindo para a disfunção orgânica¹⁰.

O Inflamasoma é um complexo proteico de receptores intracelulares do sistema imune inato que reagem a estímulos, mas também distinguem sinais de perigo celular¹¹. Dessa forma, iniciam uma resposta inflamatória com a ativação de citocinas, em particular a IL-1 β e IL-18^{12,13}. Quatro receptores citoplasmáticos compõem o complexo: criopirina /NALP3, IPAF, NALP1b, AIM2¹⁴. Conforme estudos recentes, existe uma forte associação entre a atividade do NALP 3 no *rash* cutâneo e episódios de febre prolongada na presença de infecção. Esta relação existe pela promoção da ativação da Caspase-1 com a liberação da IL-1 β e IL 18 e promoção de morte celular. O estímulo gatilho para estas reações são os

componentes da membrana celular de bactérias, como o LPS, o RNA bacteriano, as bactérias Gram positivas e pequenos componentes antivirais^{15, 16, 17}.

Os estudos do Inflamasoma tem sido amplamente realizados em experimentações com animais, bactérias e plantas. Poucas pesquisas tiveram, até o momento, participação de seres humanos com sepse, podendo ser este um diferencial nas pesquisas da doença. Um estudo avaliou a expressão de RNA mensageiro de porção do Inflamasoma no choque séptico, demonstrando uma importante correlação de sua ativação com o desenvolver de lesão tecidual¹⁸. Há relatos de avaliação de sua relação com a lesão pulmonar aguda¹⁹, proposta de uso para o diagnóstico diferencial entre sepse e doença reumatológica²⁰ e análise de nível sérico de IL-18 e relação com mortalidade em pacientes de terapia intensiva²¹, porém sem vínculo específico com doença infecciosa.

O Inflamasoma e suas cadeias de ativação são teorias baseadas em resultados desses estudos, e cada vez mais se tornam convidativas para a ampliação do conhecimento de seus mecanismos. A ideia de sua íntima relação, especialmente de seu subtipo NALP-3 com a ativação da rota da Caspase 1 e liberação e atividade das Interleucinas IL-1 β e IL-18 com a disfunção orgânica e mortalidade na sepse requerem atenção.

2. JUSTIFICATIVA

A razão da escolha do tema se prende ao fato das experiências vividas na prática clínica em Unidades de Terapia Intensiva, onde a sepse com disfunção orgânica (sepse grave) e o choque séptico são as maiores causas de mortalidade em pacientes graves.

Recentemente, os estudos do Inflamassoma, principalmente sua porção denominada NALP3, sensível a ligantes microbianos e sinais endógenos de alerta, demonstram sua relação com a ativação da Caspase 1, tendo esta fundamental importância no sistema de defesa a infecções e na progressão para disfunção orgânica e morte celular. Estas pesquisas estão sendo realizadas em modelos animais e *in vitro*, com amplas expectativas no envolvimento em processos infecciosos. Na literatura já começam a surgir publicações sobre a expressão do RNA mensageiro de componentes do Inflamassoma no choque séptico, mas ainda são poucos estudos, mas já enfatizando resultados promissores de associação. Entretanto, nenhum estudo foi realizado em pacientes internados em unidades de terapia intensiva, onde foi avaliado o envolvimento da ativação do inflamassoma e sua repercussão sobre a mortalidade nas diferentes severidades do quadro séptico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade do Inflamasoma em pacientes com sepse grave e choque séptico.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Comparar os escores clínicos de gravidade e disfunção orgânica nos diferentes grupos do estudo, relacionando-os com mortalidade;

3.2.2 Mensurar níveis séricos dos mediadores inflamatórios (IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e NO) nos pacientes de UTI incluídos no estudo, com e sem diagnóstico de sepse;

3.2.3 Relacionar os resultados de níveis plasmáticos dos mediadores inflamatórios de cada grupo com mortalidade;

3.2.4 Mensurar a atividade do inflamossoma (níveis séricos de IL-1 β e IL-18) nos diferentes grupos do estudo;

3.2.5 Relacionar a expressão de atividade do Inflamasoma na sepse, com os respectivos grupos de estudo e mortalidade.

Inflammasome: IL-18 is associated with increased mortality in patients with sepsis, independently of IL-1 β

Artigo científico submetido ao periódico científico *Critical Care Medicine*

Fator de Impacto: 6,147

Inflammasome: IL-18 is associated with increased mortality in patients with sepsis, independently of IL-1 β

Michelle Virgínia Eidt, Leonardo Pedrazza, Gabriela Caeran, Giovana Pellegrin, Denizar Alberto da Silva Melo, Lia Possuelo, Márcio Vinícius Fagundes Donadio and Jarbas Rodrigues de Oliveira*

Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre-RS, Brazil

*To whom correspondence should be addressed at: Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga 6681, prédio 12, bloco C, sala 221, CEP 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: jarbas@pucrs.br

Abstract:

Rationale: Sepsis is a major health care problem, with a significant mortality rate in intensive care units. Despite advances in biochemical studies to understand the molecular mechanisms of infection, much still needs to be clarified.

Objectives: to evaluate the association of IL-1 β and IL-18 with mortality rates in patients with severe sepsis or septic shock and to compare it with non-septic controls.

Methods: Critically ill patients with and without the diagnoses of sepsis were recruited within 24 hours of entry into the ICU. Serum levels of inflammatory mediators were measured (IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α and Nitric Oxide), and the inflammasome activity evaluated through the quantification of IL-1 β and IL-18. We have also collected clinical parameters and laboratory tests to estimate gravity and organ dysfunction (APACHE II, SOFA, lactate), medical history and realize exams for exclusion criteria (suspicion or confirmation of cancer, patients on chemotherapy or finished treatment less than one year, recently received blood products transfusion, HIV positive test and hyperuricemia). These results were compared to survivors and no survivors.

Measurements and Main Results: IL-18 was directly related to mortality independently of others inflammatory mediators measured, especially IL-1 β , although the inflammatory pathway is closely linked to inflammasome activation and both have simultaneous release in the infectious process. Mortality was directly proportional to IL-18 plasma results, which did not occur with others inflammatory mediators.

Conclusion: The results indicate IL-18 as an important predictor of mortality in humans with both severe sepsis and septic shock, independent of IL-1 β .

Keywords: Inflammasome; IL-1 β ; IL-18; sepsis; mortality

Introduction

Sepsis is a major health care problem, with a significant mortality rate in intensive care units (ICUs) (1). Studies demonstrate from 25 to 80% of mortality in cases of severe sepsis with evolution to septic shock (2). One of the major contributors to this process is the inflammatory response, together with the release of inflammatory cytokines. Despite advances in understanding the innate immune events that lead to sepsis, molecular therapies based on these advances have failed to improve sepsis mortality (3), and molecular mechanism of infection needs to be best clarified.

The innate immune system is responsible for the initial defense, starting the pro-inflammatory signaling pathways. The cytokine release in response to a pathogen infection, in order to protect the organism against injury, may act with a critical role in the host defense (4). An important key in this pathway is the Caspase-1 activation, processing the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 into their biologically active forms.

The caspase inactive form is activated by cytosolic multi-protein complexes known as inflammasomes (4,5), which act as a platform to release IL-1 β and IL-18. These interleukins are the first defense cytokines, responsible for perpetuating the inflammation, and have been implicated in the generation of the THelper response (5). However, its secretion may also promote vasodilatation and immune cell extravasation, including cell death (6). Several studies have shown its relation to organ dysfunction and septic shock, increasing morbidity and mortality (7,8,9,10). Also, there is evidence that the IL-1 β and IL-18 simultaneous neutralizing may have therapeutic potential on the treatment of septic shock (11).

Most of these studies were performed in laboratory animal models, mainly murines. A study evaluating the inflammasome mRNA expression in septic shock demonstrated a significant correlation with tissue injury process (12). Also, another study including ICU patients demonstrated the relation between IL-18 production and mortality, but no specific separations by the infectious disease were made (10).

Considering the high prevalence and mortality of sepsis, and the differences between its subtypes of organ dysfunction (severe sepsis and septic shock) in patients with similar APACHE and SOFA score, the association between inflammasome (IL-1 β and IL-18) and mortality is still poorly known in humans. Thus,

the objective of present study is to evaluate the association of IL-1 β and IL-18 with mortality rates in patients with severe sepsis or septic shock and to compare it with non-septic controls. The results demonstrated that there was an IL-18 increase in the septic groups (severe sepsis and septic shock) when compared to the control group, and a direct association with mortality, independent of IL-1 β plasma levels.

Methods

Study population

This was a cross-sectional, observational study, conducted over a six month period. Patients were enrolled within 24 hours of entry into the ICU. All consecutive patients admitted with or without severe sepsis or septic shock diagnosis in the adult ICU were assessed for possible inclusion. The sepsis/septic shock diagnosis was performed according to the American College of Chest Physicians/Society for Critical Care Medicine Consensus Conference definitions (13). He have excluded patients with hyperuricemia, confirmed or under investigation of cancer, ongoing chemotherapy or submitted to treatment in the last year, receiving blood transfusion in the last five days and with a HIV positive test. All these exclusion criteria have been clearly associated with inflammasome activation (14, 15, 16, 17).

The study protocol was approved by the University Ethical Committee (number 254965) and informed consent from all patients' relatives was obtained prior to inclusion.

Data collection, definitions and outcome measures

Laboratory tests and clinical history evaluation were performed in all consecutive patients admitted, after the informed consent form was signed. A blood sample was obtained from routine ICU collection and HIV test performed. Plasma was then separated and uremic acid concentration was measured. Clinical data was obtained by medical records revision and anamnesis with the patients (whenever possible) or relatives, by the research team trained in the study protocol. If no exclusion criteria were present, patients were included and a new blood sample was

then collected in order to measure inflammatory parameters, as explained below.

APACHE II and SOFA scores were obtained from existing medical records and exam results from ICU routine. The APACHE II severity score was calculated based on the worst clinical parameters obtained in the first 24 hours after admission into the ICU.

The main outcome measure was defined as mortality or discharge from ICU. Secondary outcomes were: lactate, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , NO, IL-1 β and IL-18.

Samples Collection

Blood sample was obtained from venous central catheter within six hours after inclusion. Plasma was separated by centrifugation of 10 mL heparinized blood at 2000 rpm for 10 minutes and stored at -80° C until assayed.

Inflammatory mediators and Inflammasome activity

Plasma lactate concentration was measured with a bench-top blood gas analyzer. Inflammatory mediators were measured in triplicate. IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α were measured by Flow Cytometer, using BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokine Kit, according to manufacturer's specifications.

The evaluation of the inflammasome activity was measured by plasma levels of IL-1 β and IL-18. The measurement of IL-1 β levels was carried out using Flow Cytometry, as described above. IL-18 was measured by ELISA, using MBL Human IL-18 ELISA Kit, according to manufacturer's instructions.

We have used the Griess method in order to determine serum NO, since it is the most frequently assay used in clinical studies (18).

Statistical Analysis

The normality of the data was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test. Variables with normal distribution were presented as mean and standard deviation. Non-parametric data was presented as median and interquartile intervals. Differences between groups were evaluated using one-way analysis of variance

(ANOVA) followed by the Fisher's least significant difference (LSD) post-hoc test or using the Kruskal-Wallis test, followed by the Mann-Whitney test adjusted with the Bonferroni correction. A Multivariate logistic regression model was used to investigate the possible influence of several factors on the main outcome (mortality). Also, ROC analysis was used for sensitivity and specificity assessment. Significance was established when $p < 0.05$ for normal variables and when $p < 0.016$ for non-parametric variables. All data analyses were performed using SPSS version 17.0 for windows (SPSS, Inc Chicago, IL).

Results

A total of seventy-eight subjects were assessed for inclusion. Thirteen patients were excluded: two in the control group due to chemotherapy treatment; five patients in the severe sepsis group (one for hyperuricemia, one for a cancer diagnosis, one for a HIV positive test and two for recent blood transfusion); and six patients in the septic shock group (two for hyperuricemia, two for cancer investigation and two for recent blood transfusion). Thus, sixty-five patients were included in the three groups: (1) *control group*, seventeen patients without sepsis or other infection (age: 62.11 ± 14.1); (2) *severe sepsis group*, twenty three patients with severe sepsis (age: 61.43 ± 18.7); and (3) *septic shock group*, twenty five patients with septic shock (age: 65.91 ± 17.76).

The characterization of the studied sample is presented in Table 1. The results show that the APACHE II score was statistically higher in the severe sepsis and septic shock groups. Mortality was also analyzed in the studied groups and results show a significant increase in both septic groups compared to the control group. Moreover, the septic shock group presented a significantly higher mortality rate when compared to the severe sepsis group.

Lactate was measured and showed a significant increase in both septic groups when compared to the control. However, there was no difference between severe sepsis and septic shock groups, which means that individuals with sepsis were in a similar perfusional stage (Figure 1).

Also, in order to investigate the relationship between mortality and inflammatory cytokines, we have measured IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α (Figure 2). IL-

6 plasma levels presented similar values between all groups (Figure 2A). Comparative analyses of IL-8 plasma levels between groups have shown a statistical increase in both septic groups compared to the controls, but no differences between severe sepsis and septic shock (Figure 2B). In order to assess whether anti-inflammatory action of IL-10 and the stimulation of TNF- α acute phase reaction could have influenced mortality, we have measured both plasma levels. However, no statistically significant differences were found between groups in both IL-10 (Figure 2C) and TNF- α (Figure 2D). We have also measured the Nitric Oxide levels and results show no significant differences between groups (Figure 3).

Our study also aimed to investigate the contribution of inflammasome activity in the pathophysiology of sepsis, through the analysis of IL-1 β and IL-18 plasma levels (Figure 4). The results show no statistical differences between groups when IL-1 β levels were measured (Figure 4A), indicating that different mortality rates were not affected by serum IL-1 β levels. However, comparative analysis of IL-18 revealed significant increases in both severe sepsis and septic shock groups when compared to the control group (Figure 4B).

When using a multivariate logistic regression analysis, results have shown that several factors, including age, sex, lactate, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , NO and IL-1 β were not significant in order to predict mortality. The analysis confirmed IL-18 as the only significant contributing factor to influence the lethal outcome in both severe sepsis (95% CI: 1.001-1.047; $p=0.037$) and septic shock (95% CI: 1.000-1.017; $p=0.05$) groups, increasing the prediction power to 88.9% and 90%, respectively. The cut-off value, sensitivity and specificity of IL-18 as a predictor of mortality were calculated using receiver operating characteristic (ROC) curve. Based on ROC curve analysis ($AUC \pm SE = 0.908 \pm 0.067$; $p=0.001$) for severe sepsis and ($AUC \pm SE = 0.904 \pm 0.070$; $p=0.001$) for septic shock, patients with elevated IL-18 levels have approximately 90% higher risk level for a lethal outcome. As a predictor of mortality at the cut-off value of 389.3 pg/mL (severe sepsis) and 522.3 pg/mL (septic shock), IL-18 shows sensitivity of 80% and 83%, respectively, and specificity of 100% (Figure 5).

Discussion

Our results have shown that several inflammatory mediators did not present significant influence on mortality in both severe sepsis and septic shock patients. However, when we analyzed the interleukins directly involved in the inflammasome activity, mortality was directly associated to the IL-18 plasma levels. IL-18 belongs to the superfamily of IL-1 and induces cell mediated immunity by stimulating natural killer cells to release cytokines for the activation of macrophages (19, 20). Multivariate logistic regression analysis showed that IL-18 was the only factor associated with the prediction of mortality. This analysis demonstrates that in severe sepsis and septic shock groups, the measurement of IL-18 may increase the prediction power of a lethal outcome to 88.9% and 90%, respectively.

IL-1 β is an important mediator of the inflammatory response involved in a variety of cellular activities including cell proliferation, differentiation and apoptosis (21). When the influence of IL-1 β plasma levels on mortality was analyzed, we did not find a significant association. So, if we consider the results demonstrated for IL-18, it seems that the association of a higher mortality with IL-18 plasma levels in patients with sepsis is independent of IL-1 β . These results would suggest that IL-18 is more closely related to a lethal outcome in sepsis than interleukin 1 β . Each one activity seems to be different in the inflammation process, according to obtained result, although acting at the same time and place, playing the same role.

A clinical trial using an IL-1 neutralizing drug in sepsis suggests an increase in survival (22). However, we suggest that the perspective shift needs to be directed to IL-18. The proposal of neutralizing both interleukins appears in a recent study, and such an approach of combination therapy might be good strategy (11). However, our results lead to a different point of view: increase the research on IL-18 and sepsis, may benefit patients in all severity stages of this disease.

Other inflammatory factors were analyzed in our study, but results showed no significant influence on mortality in patients with sepsis. In order to evaluate if tissue perfusion could be involved in this process, we have measured the concentration of lactate in these patients. However, despite the difference between control and septic groups, lactate was not directly involved in mortality. On the other hand, some studies have shown that the lactate clearance is directly related to mortality (17, 23). Also, our study showed that the plasma values of other inflammatory mediators

evaluated (IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α .) had no statistical difference between groups, and multivariate logistic regression analysis showed no association between them and mortality in sepsis.

We have also analyzed Nitric Oxide, a signaling molecule involved in immune response (24). Recent study suggests that the nitric oxide suppresses the NLRP3 inflammasome activation, protecting against septic shock (25). However, on the contrary of that, our results demonstrated that nitric oxide was not associated with mortality in sepsis.

In conclusion, the results presented here indicate IL-18 as an important predictor of mortality in humans with both severe sepsis and septic shock. The association of IL-18 and increased mortality rates is independent of IL-1 β . The study contributes to a better understanding of the association between inflammation, interleukin production and mortality in sepsis.

Acknowledgements

The authors are indebted to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for financial support.

Legends

Table 1. Characterization of the studied sample in the different experimental groups (control, severe sepsis and septic shock).

Clinical parameters were collected within 24 hours of ICU stay.

Figure 1. Comparative analysis of the Lactate plasma levels in the different groups. * $p < 0.002$ when control was compared to both severe sepsis and septic shock groups. No difference was found between severe sepsis and shock.

Figure 2. Comparative analysis of IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α plasma levels in the different groups. (A) IL-6 plasma levels: no significant differences between groups were found. (B) IL-8 plasma levels: * $p < 0.015$ when control was compared to both severe sepsis and septic shock groups. (C) IL-10 and (D) TNF- α plasma levels: no significant differences between groups were found.

Figure 3. Comparative analysis of NO plasma levels in the different groups. No statistical differences were found.

Figure 4. Comparative analysis of IL-1 β and IL-18 plasma levels in the different groups. IL-1 β has no statistical difference between groups. IL-18 has * $p < 0.001$ when control was compared to both septic shock and severe sepsis groups. # $p < 0.037$ for severe sepsis vs. septic shock.

Figure 5. ROC curve diagrams of IL-18 sensitivity and specificity in the prediction of a lethal outcome in patients with severe sepsis (AUC \pm SE = 0.908 \pm 0.067; $p = 0.001$) and septic shock (AUC \pm SE = 0.904 \pm 0.070; $p = 0.001$).

Figures

Table 1

Table 1: CLINICAL PARAMETERS FOR CONTROL, SEVERE SEPSIS AND SEPTIC SHOCK GROUPS

CHARACTERISTICS	CONTROL GROUP	SEVERE SEPSIS	SEPTIC SHOCK
<i>n</i>	17	23	25
Age, years	62.11 (± 13.9)	61.43 (± 18.7)	65.91 (± 17.76)
Sex (M/F)	10/7	14/9	10/15
APACHE II score [*]	6.4 (± 3.07)	11.4 (± 4.7)*	16 (± 6.7)* #
SOFA score ^{**}	1.82 (± 4.24)	7.21 (± 2.97) *	7.56 (± 5.23) *
ICU mortality	3/17 (17.6%)	9/23 (39%)*	12/25 (48%)* #

• Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II

•• Sepsis-related Organ Failure Assessment.

Clinical parameters were collected within 24 hours of ICU stay.

*p<0.001 Severe sepsis and Septic shock vs.Control, #p<0.001 Severe sepsis vs. Septic shock.

Figure 1

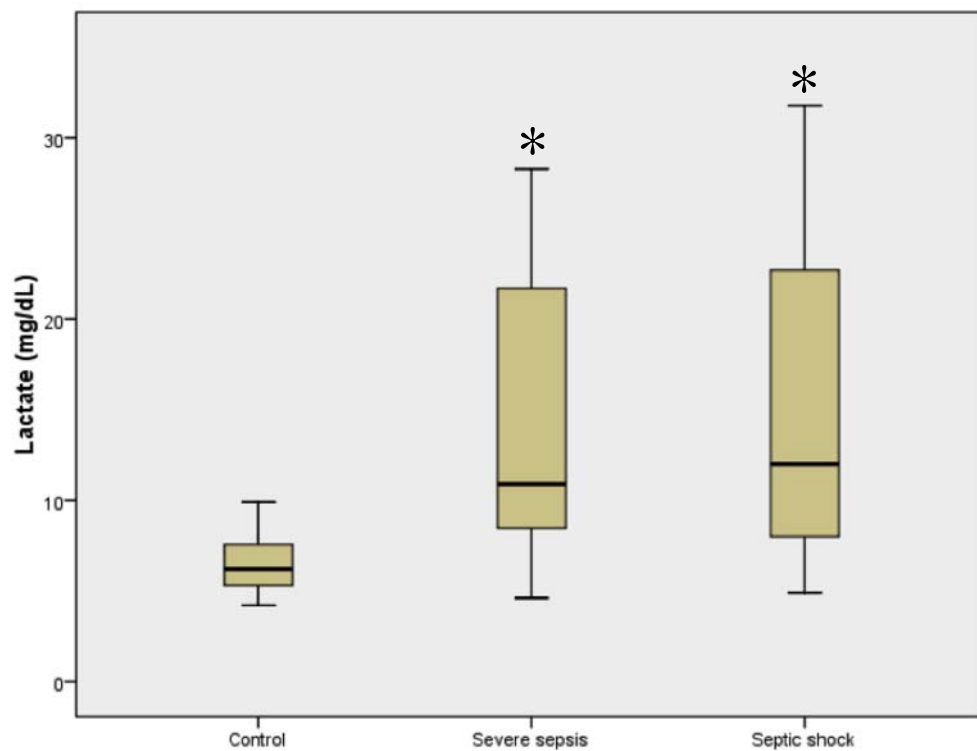


Figure 2

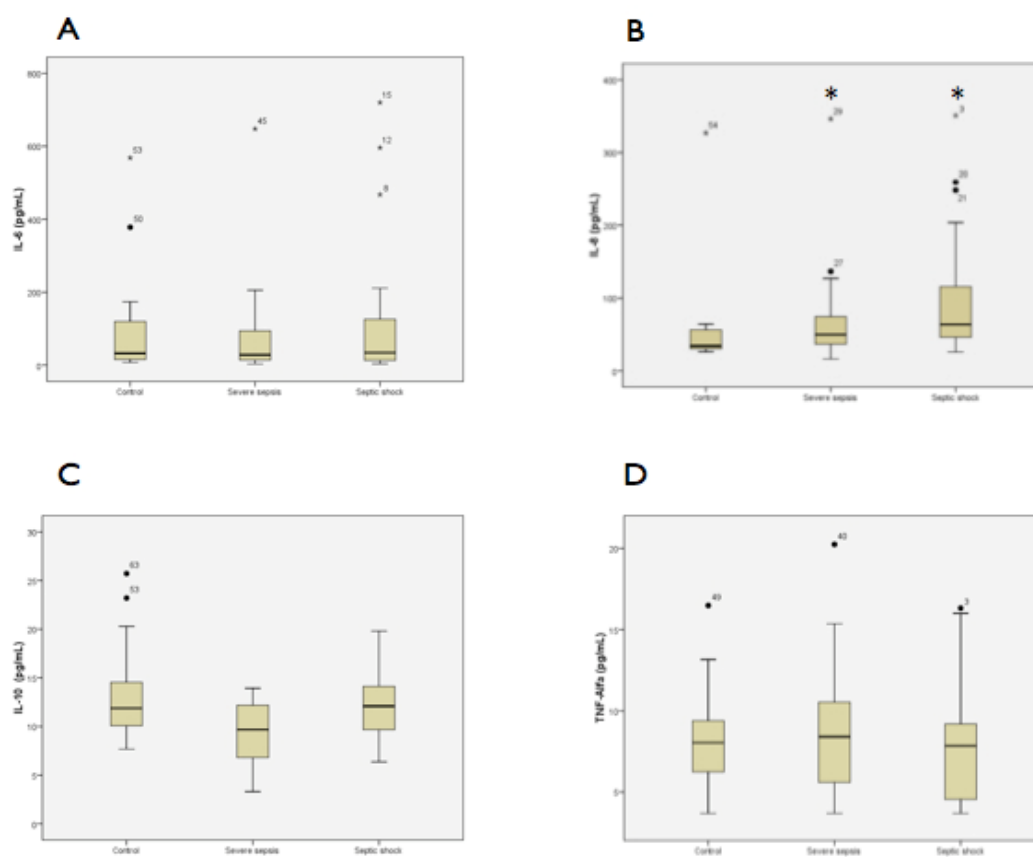


Figure 3

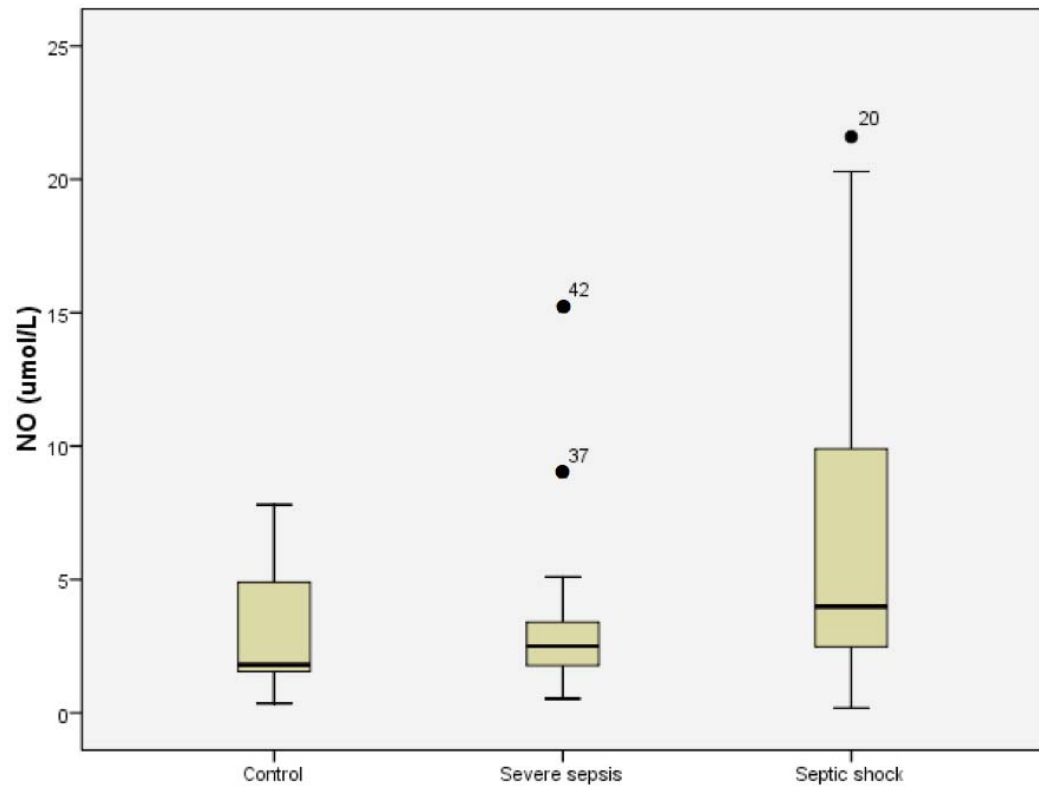


Figure 4

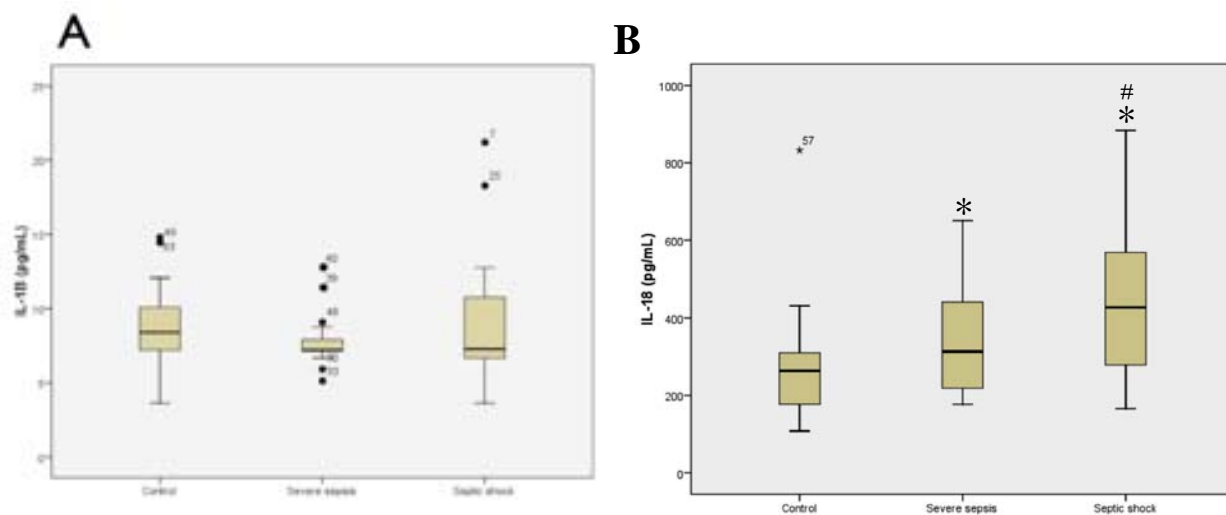
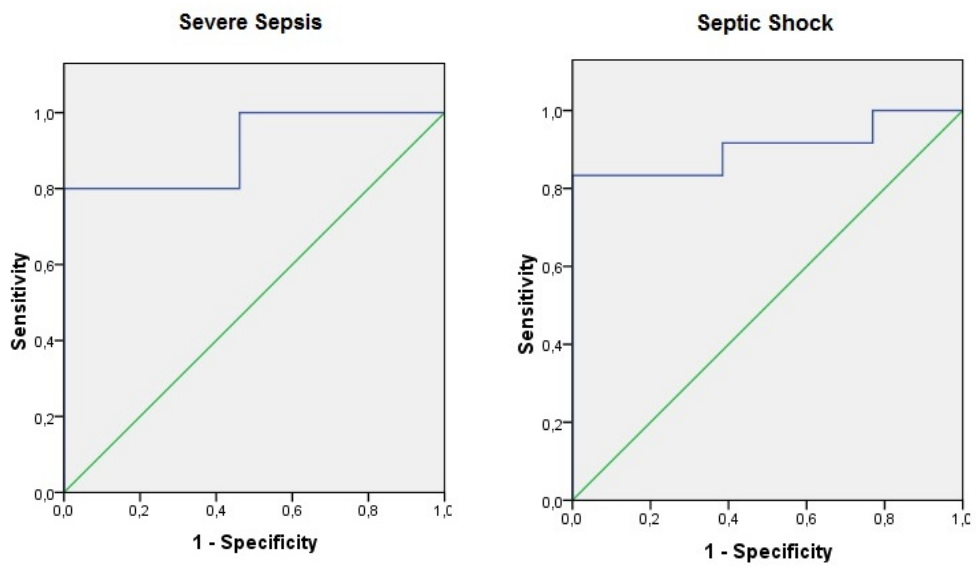


Figure 5



References

- 1- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J. et al: Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29:1303-1310.
- 3- Seeley EJ, Matthay MA, Wolters PJ: Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 303: L355– L363.
- 2- Marshall JC, Vincent JL, Guyatt G, et al. Outcome measures for clinical research in sepsis: a report of the 2nd Cambridge Colloquium of the International Sepsis Forum. *Crit Care Med* 2005; 33: 1708 – 16.
- 4- Sonal Khare, Nancy Luc, Andrea Dorfleutner and Christian Stehlik. Inflammasomes and Their Activation. *Crit Rev Immunol.* 2010; 30(5): 463–487.
- 5- Edward A. Miao¹, Irina A. Leaf¹, Piper M. Treuting², Dat P. Mao¹, Monica Dors¹, Anasuya Sarkar³, Sarah E. Warren^{1,4}, Mark D. Wewers³, and Alan Aderem¹. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol.* 2010; December; 11(12): 1136–1142. doi:10.1038/ni.1960.
- 6- Mohamed Lamkanfi, Thirumala-Devi Kanneganti, Luigi Franchi, and Gabriel Núñez¹. Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 2007; 82: 220-225.
- 7- Richard F. Jacobs, Dale R. Tabor, A. Wesley Burks, G. Douglas Campbell. Elevated Interleukin-1 Release by Human Alveolar Macrophages during the Adult Respiratory Distress Syndrome. *American Review of Respiratory Disease* 1989; Vol.140: 1686-1692.
- 8- Susanne Herold, Tannaz Shafiei Tabar, Hermann Janßen, Katrin Hoegner, Maciej Cabanski, Peter Lewe-Schlosser, Jens Albrecht, Frank Driever, Istvan Vadasz, Werner Seeger, Mirko Steinmueller, Juergen Lohmeyer. Exudate Macrophages Attenuate Lung Injury by the Release of IL-1 Receptor Antagonist in Gram-negative Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; Vol.183: 1380-1390,
- 9- Tamás D, Young SK, Judie H, Garuy MH, et al. Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2012. June 185 (11), 1225-1234.

- 10- Taihei Y, Michiko AI, Hayato Y, et al. IL-18 production and IL18 promoter polymorphisms correlate with mortality in ICU patients. *In Vivo* 2014; May-June 28 (3), 391-396.
- 11- Tom VB, Dieter D, et al. Simultaneous targeting of IL-1 and IL-18 is required for protection against inflammatory and septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; February 189 (3), 282-291
- 12- Ruairi J. Fahy, et al. Inflammasome mRNA Expression in Human Monocytes during Early Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; Vol 177. pp 983–988.
- 13- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31:1250–1256.
14. Pamela Gasse, Nicolas Riteau, Sabine Charron, Sandra Girre, Lizette Fick, Virginie Pétrilli, Jürg Tschopp, Vincent Lagente, Valérie F. J. Quesniaux, Bernhard Ryffel, Isabelle Couillin. Uric Acid Is a Danger Signal Activating NALP3 Inflammasome in Lung Injury Inflammation and Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; Vol.179: 903-913.
15. E.A. Hod, S.L. Spitalnik. Stored red blood cell transfusions: Iron, inflammation, immunity, and infection. *Transfusion Clinique et Biologique* 2012; vol. 19, 84–89.
16. Pontillo A, Silva LT, Oshiro TM, Finazzo C, Crovella S, Duarte AJ. HIV-1 induces NALP3-inflammasome expression and interleukin-1 β secretion in dendritic cells from healthy individuals but not from HIV-positive patients. *AIDS*. 2012; Jan 2; 26(1):11-8.
17. Lilian Minne¹, Ameen Abu-Hanna¹ and Evert de Jonge². Evaluation of SOFA-based models for predicting mortality in the ICU: A systematic review. *Critical Care* 2008, 12:R161.
18. Romitelli F, Santini SA, Chierici E, et al. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 851:257–67.
19. Krumm B, Xiang Y, Deng J. Structural biology of the IL-1 superfamily: key cytokines in the regulation of immune and inflammatory responses. *Protein Sci*. 2014; May; 23(5):526-38.

20. Dinarello CA, Roberta Priori, Serena Colafrancesco, Cristiano Alessandri. Interleukin-1b, interleukin-18, and the interleukin-1b converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 856:1–11.
21. Dinarello CA, Roberta Priori, Serena Colafrancesco, Cristiano Alessandri. Interleukin-1b, interleukin-18, and the interleukin-1b converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 856:1–11.
22. Opal SM, Fisher CJ Jr, Dhainaut JF, Vincent JL, Brase R, Lowry SF, Sadoff JC, Slotman GJ, Levy H, Balk RA, et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med* 1997; 25:1115–1124.
23. Nguyen HB, Loomba M, Yang JJ, Jacobsen G, Shah K, Otero RM, Suarez A, Parekh H, Jaehne A, Rivers EP. Early lactate clearance is associated with biomarkers of inflammation, coagulation, apoptosis, organ dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock. *J Inflamm (Lond)* 2010; Jan 28;7:6.
24. Green, SJ; Mellouk, S; Hoffman, SL; Meltzer, MS; Nacy, CA. Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: Cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. *Immunology letters* 1990; 25 (1–3): 15–9.
25. Kairui Mao, Shuzhen Chen, Mingkuan Chen, et al. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Cell Research* 2013; 23:201-212.

Capítulo 3

Considerações Finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sepse relacionada à disfunção de órgãos e choque continua sendo a causa mais comum de morte em UTI. Apesar das novas evidências e estudos, a incidência desta doença permanece em crescimento e a mortalidade ainda é prevalente.

Nos últimos anos, houve no meio científico importantes achados e descobertas sobre a atuação do sistema imune inato nas infecções. Complexos proteicos denominados inflamasomas são fundamentais nesse processo, modulando e tornando possível a defesa do organismo¹⁹. A liberação de citocinas em suas formas ativas tem papel principal nesse interim. A defesa de primeira linha, responsável pela perpetuação da inflamação, se dá por meio das interleucinas IL-1 β e IL-18²². Tentando proteger o organismo contra lesões, a cascata inflamatória acaba gerando dano tecidual, podendo evoluir para a morte celular, lesão orgânica e choque.

Nosso estudo foi realizado com pacientes internados em UTI adulto, com e sem diagnóstico de sepse, fazendo uso de ferramentas como APACHE II, SOFA e Lactato sérico para mensurar os graus de disfunção orgânica e gravidade. Foram realizadas contagens séricas de mediadores inflamatórios e marcadores de atividade do Inflamasoma. Nossos achados demonstraram que apenas a liberação da IL-18 está diretamente relacionada à mortalidade na sepse.

Os valores plasmáticos de IL-18 apresentam relação diretamente proporcional à mortalidade na sepse, mas quando comparado à liberação de IL-1 β , não foi possível se verificar a mesma relação. Os resultados sugerem que a IL-18 é fator preditor isolado de mortalidade na sepse, independente da fração beta da IL-1, sugerindo que cada uma atua de forma diferente na sepse, apesar do processo de ativação e as vias metabólicas serem as mesmas entre ambas.

Um ensaio clínico utilizando droga neutralizante de IL-1 na sepse sugere um aumento na sobrevivência²³. A proposta de neutralizar tanto IL-1 quanto IL-18 aparece em estudo recente, e tal abordagem da terapia de combinação pode ser uma boa estratégia²⁴. Entretanto, pode-se inferir com os dados da pesquisa que a mudança de perspectiva precisa ser direcionada para a IL-18. Os resultados levam a um ponto de vista diferente: ampliar os estudos sobre IL-18 e sepse, sugerindo o benefício terapêutico do manejo da interleucina de maior impacto na mortalidade, podendo

beneficiar pacientes em todos os estágios de gravidade da doença.

As pesquisas científicas permitem conhecer as mensagens moleculares e os códigos utilizados como estopim das respostas inflamatórias. O decifrar desses códigos representa a maior vantagem para estudos futuros e novas terapias para a sepse, possibilitando a criação de uma terapêutica guiada e específica, e não apenas sintomática.

Nossos resultados dão suporte a outras publicações, que demonstram o processo inflamatório e liberação de interleucinas como fatores que influenciam na gravidade e mortalidade na sepse, mas mostram pela primeira vez a importância da IL-18 isolada na mortalidade dessa doença, independente da IL-1 β . Tais dados refletem um grande potencial em se saber esse mecanismo de ação, que pode ser útil na descoberta de novos tratamentos. O aprimoramento das pesquisas é necessário, para que no futuro esses dados sirvam de mentores para o seguimento de investigação e terapêutica guiada, reduzindo a morbi-mortalidade desta entidade clínica.

Referências Bibliográficas

1. Boechat, A. L.; et al. Sepsis: diagnosis and treatment. *Rev Bras Clin Med* 2010; 8(5): 420-427.
2. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31:1250–1256.
3. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker JMA, et al: Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29:1303-1310.
4. João Andrade L. Sales Júnior; Cid Marcos David; Rodrigo Hatum, et al. An epidemiological study of sepsis in Intensive Care Units. Sepsis Brazil study. *Rev. Bras. Ter. Intensiva* 2006; 18 (1): 9-17.
5. Huttunen R, Aittoniemi J: New concepts in the pathogenesis, diagnosis and treatment of bacteremia and sepsis. *Journal of Infection* 2011; 63:407-419.
6. Little MC, Hurst RJ, Else KJ. Dynamic Changes in Macrophage Activation and Proliferation during the Development and Resolution of Intestinal Inflammation. *J Immunol.* 2014; Sep 26. pii: 1400502.
7. Seeley EJ, Matthay MA, Wolters PJ: Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 303: L355– L363.
8. Guarda, G.; et al. Regulation of inflammasome activity. *Immunology* 2010; 130: 329-336.
9. Sonal Khare, Nancy Luc, Andrea Dorfleutner, and Christian Stehlik. Inflammasomes and Their Activation. *Crit Rev Immunol* 2010; 30(5): 463–487.
10. Edward A. Miao¹, Irina A. Leaf¹, Piper M. Treuting², Dat P. Mao¹, Monica Dors¹, Anasuya Sarkar³, Sarah E. Warren^{1,4}, Mark D. Wewers³, and Alan Aderem¹. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol.* 2010; December; 11(12): 1136–1142.

11. Guarda, G.; et al. Regulation of inflammasome activity. *Immunology* 2010; 130: 329-336.
12. Lamkanfi, M.; et al. The inflammasomes. *Plos Pathogens* 2009; 5(12): 1-4.
13. Martinon, F.; et al. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death and Differentiation* 2007; 14: 10-22.
14. Sutterwala, F. S.; et al. The inflammasome in pathogen recognition and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 2007; 82: 259-264.
15. Richard F. Jacobs, Dale R. Tabor, A. Wesley Burks, G. Douglas Campbell. Elevated Interleukin-1 Release by Human Alveolar Macrophages during the Adult Respiratory Distress Syndrome. *American Review of Respiratory Disease* 1989; Vol.140: 1686-1692.
16. Martinon, F.; et al. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death and Differentiation* 2007; 14: 10-22.
17. Sutterwala, F. S.; et al. The inflammasome in pathogen recognition and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 2007; 82: 259-264.
18. Ruairi J. Fahy, et al. Inflammasome mRNA Expression in Human Monocytes during Early Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; Vol 177. pp 983–988.
19. Dolinay T, Kim YS, Howrylak J, Hunninghake GM, An CH, Fredenburgh L, Massaro AF, Rogers A, Gazourian L, Nakahira K, Haspel JA, Landazury R, Eppanapally S, Christie JD, Meyer NJ, Ware LB, Christiani DC, Ryter SW, Baron RM, Choi AM. Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: 1225–1234.
20. Antonina Minniti, Carlo Perricone, Giancarlo Iaiani, Donatella Palazzo and Guido Valesini. Interleukin 18: A Biomarker for Differential Diagnosis Between Adult-onset Still's Disease and Sepsis. *J Rheumatol* 2014; 41;1118-1123.
21. Taihei Y, Michiko AI, Hayato Y, et al. IL-18 production and IL18 promoter polymorphisms correlate with mortality in ICU patients. *In Vivo* 2014; May-June 28 (3), 391-396

- 22.** Dinarello CA. Roberta Priori, Serena Colafrancesco, Cristiano Alessandri. Interleukin-1b, interleukin-18, and the interleukin-1b converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 856:1–11.
- 23.** Opal SM, Fisher CJ Jr, Dhainaut JF, Vincent JL, Brase R, Lowry SF, Sadoff JC, Slotman GJ, Levy H, Balk RA, et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med* 1997; 25:1115–1124.
- 24.** Tom VB, Dieter D, et al. Simultaneous targeting of IL-1 and IL-18 is required for protection against inflammatory and septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; February 189 (3), 282-291.

APÊNDICE A

Society of Critical Care Medicine

The Intensive Care Professionals



Critical Care Medicine is the official journal of the Society of Critical Care Medicine and is published monthly by the Society of Critical Care Medicine and Lippincott Williams & Wilkins.

EXECUTIVE COMMITTEE

PRESIDENT

J. Christopher Farmer, MD, FCCM

Professor of Medicine and Consultant
in Critical Care Medicine

Mayo Clinic
Phoenix, Arizona USA

PRESIDENT-ELECT

Craig M. Coopersmith, MD, FCCM

Professor of Surgery
Director, Surgical Intensive Care Unit
Associate Director, Emory Center for Critical Care
Emory University School of Medicine
Atlanta, Georgia USA

TREASURER

Todd Dorman, MD, FCCM

Senior Associate Dean for Education Coordination
Associate Dean Continuing Medical Education
Professor & Vice Chair for Critical Care
Department of Anesthesiology & Critical Care Medicine
Joint Appointments in Medicine, Surgery
and the School of Nursing
Johns Hopkins University School of Medicine

SECRETARY

Ruth M. Kleinpell, RN-CS, PhD, FCCM

Director, Center for Clinical Research and Scholarship
Rush University Medical Center
Chicago, Illinois USA

PAST PRESIDENT

Carol Thompson, PhD, CCRN, FCCM

Professor Critical Care Nursing
University of Tennessee Health Science Center
Memphis, Tennessee USA

SCCM COUNCIL

Heatherlee Bailey, MD, FCCM

Heidi L. Frankel, MD, FCCM

Sandra L. Kane-Gill, PharmD, MS, FCCM

Lewis J. Kaplan, MD, FCCM

Lynn A. Kelso, MSN, ACNP, FCCM

Greg S. Martin, MD, MSc, FCCM

Steven J. Martin, PharmD, BCPS FCCM

M. Michele Moss, MD, FCCM

Vinay M. Nadkarni, MD, FCCM

Andrew J. Patterson, MD, PhD, FCCM

Beth Taylor, MS, RD, FCCM

Michael H. Wall, MD, FCCM

Jerry J. Zimmerman, MD, PhD, FCCM

CHIEF EXECUTIVE OFFICER/ EXECUTIVE VICE PRESIDENT

David Julian Martin, CAE

SCCM STAFF LIAISON

Diana Hughes, CAE

www.sccm.org

Instructions for Authors

Critical Care Medicine is an international, peer-reviewed journal that is interested in publishing the highest quality scientific studies in the field of critical care medicine. Last year, approximately 25% of the original manuscripts submitted to the journal for publication were accepted. This is a shortened version of the Author Instructions which highlights the main points. For a full version of the document please go to <http://www.editorialmanager.com/ccmed>

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscripts are submitted through Editorial Manager®, a web-based manuscript tracking system in use by the Society of Critical Care Medicine (SCCM). This system allows authors to track the status of a submission, while shortening the time needed for Editorial Office processing and peer review. To submit manuscripts for consideration, go to <http://www.editorialmanager.com/ccmed>. Once you reach the Editorial Manager® home page, log on to the system by creating an account or entering through your existing account.

Editorial Manager® will easily guide authors through the manuscript submission process. The Editorial Office is automatically notified of the submission and will send a confirmation e-mail to the author(s). A manuscript number will be assigned after the editorial office has reviewed your submission and found that it is complete, which includes having the copyright/financial disclosure forms for the author and all co-authors. At that time you will be sent an email notifying you of your manuscript number for future reference.

Copyright ownership is to be transferred in a written statement, which must accompany all manuscript submissions and must be signed by all authors. Any author who has a relationship with an organization or entity with a financial interest in or in financial competition with the subject matter or materials discussed in the manuscript should disclose that affiliation in two ways: 1) a statement revealing any financial affiliation(s) should be included on the manuscript title page, including the financial support for the research; 2) each author must complete and submit the journal's copyright transfer agreement, which includes a section on the disclosure of potential conflicts of interest based on the recommendations of the International Committee

of Medical Journal Editors, "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (www.icmje.org/update.html). **The form must be completed by each author and must be uploaded with your other manuscript documents at the time of submission.** The form is readily available on the manuscript submission page <https://www.editorialmanager.com/ccm> and must be completed and submitted electronically. Additionally, authors should disclose any potential intellectual or ethical conflicts of interest in the cover letter.

See the full online version of the Author Instructions for complete information regarding conflicts of interest and copyright ownership transfer.

Information on the following topics can be found in the full on-line Author Instructions:

Manuscript Submission

- Copyright
- Compliance With NIH and Other Research Funding Agency Accessibility Requirements
- Financial Disclosure and Conflicts of Interest
- Human and Animal Subjects
- Statistical Review

Manuscript Preparation

Manuscript Content

- Title Page
- Abstracts
- Text Material
- References
- Equations
- Tables
- Figures
- Units of Measure
- Manufacturer
- Drug Names
- Permissions
- Supplemental Digital Content

Manuscript Categories include those listed below. For a full description and word allowances please refer to the on-line Author Instructions.

Original Articles. These include randomized controlled trials, intervention studies, laboratory and animal research, outcome studies, cost-effectiveness analyses, and case-control series.

Review Articles. These consist of critical assessment of the literature and data pertaining to clinical topics.

Brief Reports. These should be short reports of original studies or evaluations.

Case Reports. These should be reports about specific cases.

Letters to the Editor. Letters must specifically address a recent article published in *Critical Care Medicine* and cannot report any new un-reviewed data.

Invited Editorials. These represent commentaries addressing newly published articles in the journal and are by invitation only.

EDITORIAL REVIEW

All manuscripts will be reviewed by Editorial Board members or consultants selected

by the editor-in-chief. Initial editorial reviews usually are completed within 8-10 weeks of manuscript submission. The time required for review of revised manuscripts is variable.

PERMISSIONS

For permission and/or rights to use content for which the copyright holder is LWW or the society, please go to the journal's Web site and after clicking on the relevant article, click on the "Request Permissions" link under the "Article Tools" box that appears on the right side of the page. Alternatively, send an e-mail to customer-care@copyright.com.

CONTACT

Questions regarding the status of submitted manuscripts are best answered by logging on to the FAQ section of Editorial Manager®. The assigned manuscript number will allow authors to view the status of their manuscript. If authors need additional information regarding a manuscript, please send an e-mail to journals@sccm.org and include your manuscript number in the request, or call (847) 827-6869 Monday through Friday, from 0800 to 1700, Central Standard Time.

All correspondence can be sent to:
Joseph E. Parrillo, MD, MCCM
Editor-in-Chief, *Critical Care Medicine*
Society of Critical Care Medicine
500 Midway Drive
Mount Prospect, IL 60056

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa:

ATIVIDADE DO INFLAMOSSOMO EM PACIENTES COM SEPSE GRAVE E SEPSE CHOQUE SÉPTICO

Justificativa e objetivos da pesquisa:

Você está sendo convidado para participar desta pesquisa, que pesquisa tem por objetivo estudar as características inflamatórias de pessoas internadas em unidades de terapia intensiva (UTIs). Algumas pessoas internadas em UTIs podem apresentar uma complicação infecciosa com o desenvolvimento de disfunção orgânica, denominada sepse grave, e choque séptico. Esta pode causar alterações importantes no funcionamento dos outros órgãos do corpo humano.

Cada pessoa tem particularidades próprias em relação as suas características celulares. Assim, algumas pessoas internadas em uma UTI podem ter maior ou menor predisposição a desenvolver uma complicação. O objetivo principal desta pesquisa é estudar pessoas internadas em UTIs que desenvolveram ou não sepse grave e choque séptico para entender se há alguma associação entre suas características inflamatórias com a ocorrência de disfunção orgânica, e se há associação com as outras complicações decorrentes da sepse.

Para isso, nós analisaremos o plasma dos pacientes que estiverem internados na Unidade de Tratamento Intensivo Adulto do Hospital Santa Cruz - UTI / HSC. O material será obtido através de uma amostra do sangue que é coletado durante os procedimentos de rotina do paciente internado na UTI / HSC.

Serão estudados marcadores inflamatórios e o inflamosomo, através dos quais será possível se ter um perfil da resposta inflamatória de cada pessoa. Os nomes dos marcadores que serão estudados são IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , NO, IL-1 e IL-18. Após a análise do material, serão comparados os resultados provenientes com os dados que refletem o estado geral de saúde do paciente. Com este estudo esperamos compreender melhor: (I) o quanto as características e ativação inflamatória influenciam no sucesso da recuperação de um paciente de UTI; (II) se as alterações do inflamasoma correspondem a mortalidade. Quando isto for desvendado, a medicina poderá contar com mais um indicador biológico que auxiliará no diagnóstico, na prevenção e no tratamento de diferentes doenças complexas.

Os procedimentos a serem utilizados:

Para realizar este estudo, vamos usar parte de uma amostra do sangue que é coletado durante os procedimentos de rotina do paciente internado na UTI / HSC. Também serão consultados os dados bioquímicos, fisiológicos e clínicos presentes no prontuário de cada paciente.

Os desconfortos ou riscos esperados:

O paciente não estará exposto a nenhum desconforto em decorrência da participação neste estudo, pois serão utilizadas amostras de material biológico e dados coletados na rotina da UTI / HSC.

Garantia de resposta a qualquer pergunta;

O paciente (ou responsável) deve sentir-se à vontade para fazer qualquer pergunta a fim de esclarecer suas dúvidas. Os responsáveis pela pesquisa garantidamente responderão.

Rubrica do Paciente (ou responsável)

Rubrica do Pesquisador

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Os benefícios que se pode obter:

Neste momento, o paciente não receberá nenhum benefício direto em decorrência deste estudo. Ainda não são bem conhecidos os efeitos que a cascata inflamatória e o inflamasoma possuem sobre as pessoas. No entanto, haverá benefícios para a ciência, pois os dados do paciente estarão contribuindo na descoberta de indicadores que auxiliarão futuramente o diagnóstico, a prevenção e o tratamento das doenças complexas.

No futuro, caso alguma informação considerada importante seja identificada no material genético analisado em decorrência desta pesquisa, os pesquisadores buscarão o paciente (ou familiares) para oferecer-lhe acesso a tal informação.

Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si:

Caso o paciente (ou o responsável) tenha vontade de ser retirado da pesquisa, isso poderá ser feito a qualquer momento, sem necessidade de que se apresentem justificativas e sem que se ele sofra qualquer tipo de prejuízo. Unicamente o paciente (ou o responsável) deverá comunicar aos pesquisadores sua decisão de abandonar a pesquisa, retirando-se o consentimento dado.

Compromisso com informação atualizada do estudo;

Toda e qualquer informação atualizada sobre este estudo estará à disposição de todos os que participam do mesmo. Os resultados deste estudo poderão ser comunicados aos pacientes (ou responsáveis), sempre que solicitados.

Garantia de acompanhamento adequado;

A equipe de profissionais de saúde que atende no UTI / HSC tem uma rotina estabelecida no acompanhamento dos pacientes da UTI. Esta rotina de atendimento ao paciente não será alterada em nada por ocasião deste estudo. Assim, garantimos que a concordância ou não na participação deste estudo não implicará em qualquer modificação na rotina do tratamento já estabelecido para os pacientes. Os resultados destes exames não terão efeito algum sobre o paciente.

Garantia de Privacidade:

A dignidade e a privacidade do paciente, em relação a qualquer dado utilizado nesta pesquisa, serão mantidas. Os dados dos pacientes estarão protegidos pelos pesquisadores responsáveis contra qualquer tipo de uso que não os previstos na investigação. Além disto, os dados receberão um número pelo qual serão identificados, garantindo assim, também, o anonimato dos pacientes. A identidade do paciente será, portanto, totalmente desconhecida pela equipe do trabalho de pesquisa ou por qualquer outra pessoa.

Permissão para uso da amostra e outros dados em estudos futuros:

A partir da mesma amostra do material coletado, poderão ser futuramente estudados outras estruturas a serem conhecidas como componentes da inflamação. Para isso, o paciente (ou responsável) poderá permitir que sua amostra seja usada em novos estudos. Mesmo que esta permissão seja dada, estudos futuros só poderão ser realizados desde que sejam aprovados antes por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Rubrica do Paciente (ou responsável)

Rubrica do Pesquisador

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ (preencher com nome do responsável) fui informado dos objetivos da pesquisa acima, de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito dos procedimentos do estudo e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. A equipe da Dra Michelle Virgínia Eidt certificou-me de que todos os dados referentes ao paciente desta pesquisa serão confidenciais, bem como o seu tratamento não será modificado em razão desta pesquisa e que, ainda, terei a liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa se assim o desejar. Assim, como responsável pelo paciente _____ (preencher com nome do paciente), dou consentimento para que ele participe da pesquisa.

Paralelamente, permito que a amostra de material seja usada em pesquisas futuras, sem a necessidade de nova consulta, desde que os novos estudos sejam devidamente aprovados por um Comitê de Ética em Pesquisa e estejam sob responsabilidade do mesmo Pesquisador Coordenador. Fui informado que, também nesta situação, caso alguma informação considerada importante seja identificada na amostra analisada em decorrência da pesquisa, os pesquisadores poderão buscar ao paciente (ou ao responsável) para oferecer-lhe acesso a tal informação.

() não permito que o material seja usado em novos estudos.

Caso tenha novas perguntas sobre este estudo, posso telefonar a Dra Michelle Virginia Eidt nos telefones (51) 9990.3223 ou (51) 3713.7400 (HSC). Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo, ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar também ao Dr Jarbas Rodrigues de Oliveira no telefones (51) 33203000, solicitando transferir a ligação para o Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, ou os responsáveis pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-PUCRS no telefone (51) 3320 3345. As ligações para os celulares poderão ser realizadas a cobrar.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Assinatura do Paciente
ou Responsável

Nome

Data

Assinatura do Pesquisador

Nome

Data

Na impossibilidade de autonomia para a leitura deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o mesmo foi lido para _____ (preencher com nome do paciente ou do responsável) em _____ (data) pelo pesquisador _____ (preencher com nome do pesquisador) enquanto eu estava presente como testemunha.

Assinatura da Testemunha

Nome

Data

___ / ___ / 20___