

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

FREQUÊNCIA REDUZIDA DE GENES KIR ATIVADORES
EM PACIENTES COM SEPSE

Luciana Mello de Oliveira

PORTO ALEGRE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

FREQUÊNCIA REDUZIDA DE GENES KIR ATIVADORES
EM PACIENTES COM SEPSE

Luciana Mello de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

PORTO ALEGRE

2016

Oliveira, Luciana Mello de.

Frequência reduzida de genes KIR ativadores em pacientes com sepse /

Luciana Mello de Oliveira; Orientador Rafael Roesler - 2016.

125f. il. col.

Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina – Ciências Médicas. Porto Alegre, RS, BR, 2016.

1. Sepse. 2. Natural killer. 3. Receptores KIR. 4. Polimorfismos genéticos. I. Roesler, Rafael. II. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Melissa Medeiros Markoski

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia, IC-FUC

Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências da Saúde, PUCRS

Profa. Dra. Maria Lucia Scroferneker

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS

Prof. Dr. Fabio Klamt

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS

Para meus pais.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Rafael Roesler, meu orientador, pela acolhida e estímulo recebido para realização desta pesquisa. Obrigada pelo apoio recebido nos últimos dez anos e pela confiança no meu trabalho.

Ao Professor Doutor Luiz Fernando Jobim e à Doutora Mariana Jobim Wilson por terem viabilizado a execução deste projeto no Laboratório de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

À Doutora Pamela Portela, pelo imensurável apoio técnico, analítico e prático, e pela amizade que desenvolvemos nestes quatro anos.

Ao Professor Doutor Fernando Dias, por sua generosidade em compartilhar da sua pesquisa original e pela oportunidade de trabalhar com seus pacientes.

Ao Professor Gilberto Schwartzmann, pelo apoio na captação de recursos e à Professora Clarice Sampaio Alho, pelo apoio recebido para a execução da pesquisa.

Aos meus familiares e amigos, que compreenderam meus momentos de ausência, que se dispuseram a ouvir-me nos momentos de dificuldade, e que são o alicerce da minha vida.

Aos pacientes e, principalmente, seus familiares, que foram abordados em um momento difícil de suas vidas e aceitaram generosamente participar desta pesquisa, o meu agradecimento.

“Nothing great was ever achieved without enthusiasm.”

Ralph Waldo Emerson

“... mar calmo nunca fez bom marinheiro.”

(desconhecido)

RESUMO

Base teórica: A sepse é uma síndrome heterogênea, definida como disfunção orgânica que ameaça à vida, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção. É um problema de saúde mundial, graças à sua alta prevalência, morbimortalidade associada, além de custos para seu tratamento. As células *Natural Killer* (NK) fazem parte do sistema imune inato reconhecendo moléculas de HLA de classe I em células alvo, através de seus receptores de membrana *killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIR). A intensidade da resposta à infecção pode variar entre indivíduos, logo pode-se considerar que esta seja determinada por bases genéticas, e estas influenciem na ocorrência de sepse e variabilidade nos desfechos.

Objetivos: Avaliar a associação entre os genes KIR e os ligantes HLA em pacientes críticos, comparando pacientes com sepse e controles não sépticos internados na mesma UTI.

Métodos: Foi examinado o polimorfismo de 16 genes KIR e seus ligantes HLA em 271 pacientes críticos, caucasóides, sendo 211 pacientes com sepse e 60 controles, pela técnica de PCR-SSO e PCR-SSP, respectivamente.

Resultados: Os genes ativadores KIR2DS1 e KIR3DS1 foram mais frequentes nos controles que nos pacientes com sepse (41,23% *versus* 55,00%, e 36,49% *versus* 51,67%; $p = 0.041$ e $0,025$, respectivamente). Estes resultados

fornece informação inicial sobre o papel de polimorfismos de KIR na sepse, sugerindo que este possa ser um potencial marcador diagnóstico ou prognóstico da doença.

Palavras-chave: antígeno leucocitário humano, células natural killer, genes KIR, receptores KIR, sepse.

ABSTRACT

Background: Sepsis is a heterogeneous syndrome, defined a life-threatening organic dysfunction caused by a dysregulated host response to infection. Sepsis is a global health problem, due to its high prevalence, associated morbidity and mortality, and costs for its treatment. Cells Natural Killer (NK) cells are part of the innate immune system that recognize HLA class I molecules on target cells via membrane receptors called killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR). The intensity of the response to an infection may vary among individuals and might be influenced genetic features affecting sepsis occurrence and variability in outcomes.

Objectives: To evaluate the association between KIR genes and HLA ligands in critically ill patients, comparing patients with sepsis and without sepsis admitted to the same ICU.

Methods: We examined the polymorphism of 16 KIR genes and their HLA ligands in 271 critically ill patients, Caucasians, and 211 patients with sepsis and 60 controls by PCR-SSO and PCR-SSP, respectively.

Results: Activating KIR2DS1 and KIR3DS1 genes were more common in controls than in patients with sepsis (41.23% versus 55.00% and 36.49% versus 51.67%, $p = 0.041$ and 0.025 , respectively). These results provide initial information on the role of polymorphism of KIR in sepsis, suggesting that this may be a potential diagnostic or prognostic marker of the disease.

Keywords: human leukocyte antigen, natural killer cells, KIR genes, KIR, sepsis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estratégia de busca de referências bibliográficas.

Figura 2: Relação entre infecção, SIRS, disfunção orgânica, sepse e sepse grave, de acordo com o Consenso de Sepse.

Figura 3: Relação entre infecção, SIRS, disfunção orgânica sepse e sepse grave, de acordo com o Segundo Consenso de Sepse.

Figura 4: Escore APACHE II e os respectivos valores pontuados conforme disfunção em órgãos e sistemas. Este escore considera valores dos parâmetros temperatura, pressão arterial média, frequências cardíaca e respiratória, oxigenação, pH arterial, sódio e potássio séricos, creatinina, hematócrito e leucometria, e a escala de Glasgow (54).

Figura 5: Risco de morte em 28 dias na UTI a partir do Escore APACHE II (54).

Figura 6: Modelo de disfunção orgânica provocada pelo estímulo do sistema imune.

Figura 7: Relação entre NK e DC.

Figura 8: Funções de células NK.

Figura 9: Relação entre NK e célula-alvo, de acordo com a ausência ou presença de ligantes HLA.

Figura 10: Receptores KIR na membrana celular.

Figura 11: Haplótipos A e B.

Figura 12: genes KIR e sua frequência em pacientes sépticos (n = 211) e controles (n = 60) em uma população de pacientes críticos do Sul do Brasil.

Figura 13: Comparação da sobrevivência hospitalar (em dias) entre pacientes sépticos (n = 211) e controles (n = 60) em uma população de pacientes críticos do Sul do Brasil.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios diagnósticos para sepse.

Tabela 2: Critérios diagnósticos para sepse grave.

Tabela 3: Escore SOFA.

Tabela 4: Escore *qSOFA*.

Tabela 5: Receptores KIR e seus ligantes específicos.

Tabela 6: Comparação da frequência de genótipos KIR entre pacientes sépticos e controles em uma população de pacientes críticos do Sul do Brasil.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACCP	American College of Chest Physicians
ACEP	American College of Emergency Physicians
APACHE II	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II
BASES	Brazilian Sepsis Epidemiological Studies
CAT	Catalase
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
CIT	Cauda intracitoplasmática
CLIR	Receptores inibitórios tipo lectina C
DAMsP	Padrões moleculares associados ao perigo
DC	Células dendríticas
DMOS	Disfunção de múltiplos órgãos e sistemas
EUA	Estados Unidos da América
ESICM	European Society of Intensive Care Medicine
GPx	Glutathione peroxidase
HLA	Antígeno leucocitário humano
IL	Interleucina
ILAS	Instituto Latino-Americano de Sepsis
INF- α	Interferon alfa
INF- β	Interferon beta
INF- γ	Interferon gama
JAMA	Journal of American Medical Association
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptors

LMIC	Low and middle income countries
LPS	Lipopolissacarídeos
MHC-I	Complexo principal de histocompatibilidade
NFkB	Fator nuclear kappa B
NK	Natural Killer
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PAF	Fator ativador plaquetário
PAI-1	Inibidor-1 da ativação do plasminogênio
PRR	Padrões moleculares associados a patógenos
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TLR	Toll like receptors
TM	Porção transmembrana
SOD	Superóxido dismutase
SOFA	Sequential Organ Failure Assesment
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
qSOFA	Quick Sequential Organ Failure Assesment
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

ÍNDICE

BANCA EXAMINADORA	4
AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	16
1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1. ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES ...	23
2.2. SEPSE	26
2.2.1. BREVE HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA DA SEPSE	26
2.2.2. DEFINIÇÃO E DIAGNÓSTICO DE SEPSE	29
2.2.2.1. PRIMEIRO CONSENSO DE SEPSE	29
2.2.2.2. SEGUNDO CONSENSO DE SEPSE	31
2.2.2.3. TERCEIRO CONSENSO DE SEPSE OU SEPSIS-3	34
2.2.3. AVALIAÇÃO DE GRAVIDADE E PROGNÓSTICO DO PACIENTE COM SEPSE	38
2.2.3.1. SEPSIS-RELATED ORGAN FAILURE ASSESMENT (SOFA)	38
2.2.3.2. APACHE II	40
2.2.4. FISIOPATOLOGIA DA SEPSE	42
2.3. CÉLULAS NATURAL KILLER	50
2.3.1. O SISTEMA IMUNOLÓGICO E O PAPEL DAS CÉLULAS NATURAL KILLER 50	
2.3.2. RECEPTORES DE NK	54
2.3.2.1. RECEPTORES KIR	56
2.3.3. DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA DE KIR	60
2.3.4. LIGANTES DOS RECEPTORES KIR	61
2.3.5. INFLUÊNCIA DE KIR NO CURSO DE DOENÇAS	63
2.4. MARCO TEÓRICO	66
3. JUSTIFICATIVA PARA REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO	68
4. OBJETIVOS	69
4.1. OBJETIVO GERAL	69

4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	69
5.	REFERÊNCIAS	71
5.	ARTIGO ORIGINAL.....	87
6.	DADOS NÃO PUBLICADOS	116
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	120
8.	ANEXOS	122
8.1.	STROBE CHECKLIST	122
8.2.	PROTOCOLO DE PESQUISA.....	125
8.3.	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	126
8.4.	CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO	129
8.5.	TERMO DE CONHECIMENTO DE PESQUISA	130
8.6.	TERMO DE CONFIDENCIALIDADE DOS DADOS.....	131
8.7.	COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO ORIGINAL	132

1. INTRODUÇÃO

A sepse, o choque séptico e a disfunção de múltiplos órgãos são as principais causas de mortalidade nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI). A taxa de mortalidade é alta, porém variável, dependendo de fatores que incluem a severidade da sepse, a idade do paciente, as co-morbidades e o tempo de internação (1). Pacientes sépticos podem permanecer hospitalizados por períodos extensos (2), necessitando de intenso suporte à vida e acarretando altos custos às instituições hospitalares (1). É um dos principais problemas de saúde pública nas UTIs brasileiras, onde aproximadamente 25% dos pacientes internados em UTI manifestam um quadro compatível com sepse grave desde a internação ou desenvolverão o mesmo durante sua permanência na unidade (3).

Podemos definir sepse, portanto, a presença suspeita ou documentada de infecção, associada a uma resposta inflamatória sistêmica (4). Na sepse, o controle da resposta inicial à infecção é superado, ocorrendo uma reação inflamatória sistêmica exacerbada e extremamente danosa. O excesso dos mediadores inflamatórios, como citocinas, provoca uma resposta fisiológica inadequada e interfere na função normal tecidual, levando ao dano celular e à função de múltiplos órgãos e, em alguns casos, ao óbito (5-11).

As células *Natural Killer* (NK) fazem parte da imunidade inata e correspondem a cerca de 10 a 20% dos linfócitos circulantes. Os genes KIR

(do inglês, “*killer cell immunoglobulin-like receptor*”) são receptores das células NK que estão envolvidos na patogênese de várias doenças, como tumores, rejeição de transplantes de células hematopoiéticas e infecções. São moléculas localizadas na superfície de NK e em subpopulações de linfócitos T NK codificadas no cromossomo 19q13.4. São divididos em grupos funcionais inibidores, que evitam a lise da célula alvo, e ativadores, que causam a lise da célula alvo (12, 13). Os receptores KIR são resultado da expressão de um sistema genético polimórfico. Até o momento foram descobertos 15 genes e 2 pseudogenes (14).

A atividade da célula NK é parcialmente controlada pela interação entre o receptor KIR das células NK e seus respectivos ligantes HLA de classe I na célula-alvo. A ausência e a presença dos ligantes inibidores e ativadores pode ser de grande importância na patogênese de doenças, podendo diminuir ou aumentar atividade da célula NK, melhorando ou piorando variadas doenças em que o papel da imunidade inata é de grande importância. As células NK reconhecem as moléculas de HLA de classe I clássicas (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e não clássicas (HLA-E e HLA-G), presentes nas células, por intermédio desta família de receptores de superfície envolvida na sua atividade citolítica (12-13).

Células NK podem ser ativadas e se tornarem citotóxicas também pela expressão exagerada de ligantes para receptores de ativação na superfície da célula-alvo. Dessa maneira, a vigilância imunológica pode ser realizada pelas NK, tanto pela expressão diminuída ou ausente de moléculas HLA nas células-alvo quanto por distúrbio do equilíbrio entre sinais ativadores e inibitórios mediados por receptores KIR (14). Existem diversas publicações que focam na

relação entre polimorfismos de KIR e diversas doenças, mas até então não existem publicações que focam na expressão de KIR e suscetibilidade à sepse.

Este trabalho avaliou o polimorfismo de genes KIR e HLA em amostras de DNA coletadas de pacientes críticos do Hospital São Lucas no período de 2004 a 2010 e armazenadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Atendeu aos requisitos considerados adequados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP - PUCRS) constantes na *“Proposta de Normas e Diretrizes para a Institucionalização e Utilização de Dados e Amostras de Bancos de Material Biológico Humano em Projetos de Pesquisa”* (BioBanco-PUCRS), conforme *“Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”* apresentado em anexo (7.3.).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Esta revisão da literatura está focada nos fatores envolvidos na definição, epidemiologia e prognóstico da sepse, além de sua fisiopatologia, particularmente no que diz respeito ao papel do sistema imune e de receptores de células Natural Killer (KIR). Foram incluídos artigos publicados no período de 1990 a 2016. A busca bibliográfica inicia-se em 1990 em função do aumento de interesse científico sobre a sepse nesta década. A estratégia de busca envolveu as bases de dados SciELO e PubMed, utilizando as palavras-chave “sepsis”, “sepsis polymorphisms”, “Natural killer cell”, “KIR genes”, “human leukocyte antigen”, “immune system” e combinações, conforme apresentado abaixo na Figura 1.

Os artigos foram inicialmente selecionados a partir de informações constantes no título. Artigos duplicados foram excluídos. Após, realizou-se leitura dos *abstracts*; finalmente, foi realizada a leitura na íntegra e avaliação de adequação para esta revisão. Finalmente, foram incluídas 137 referências.

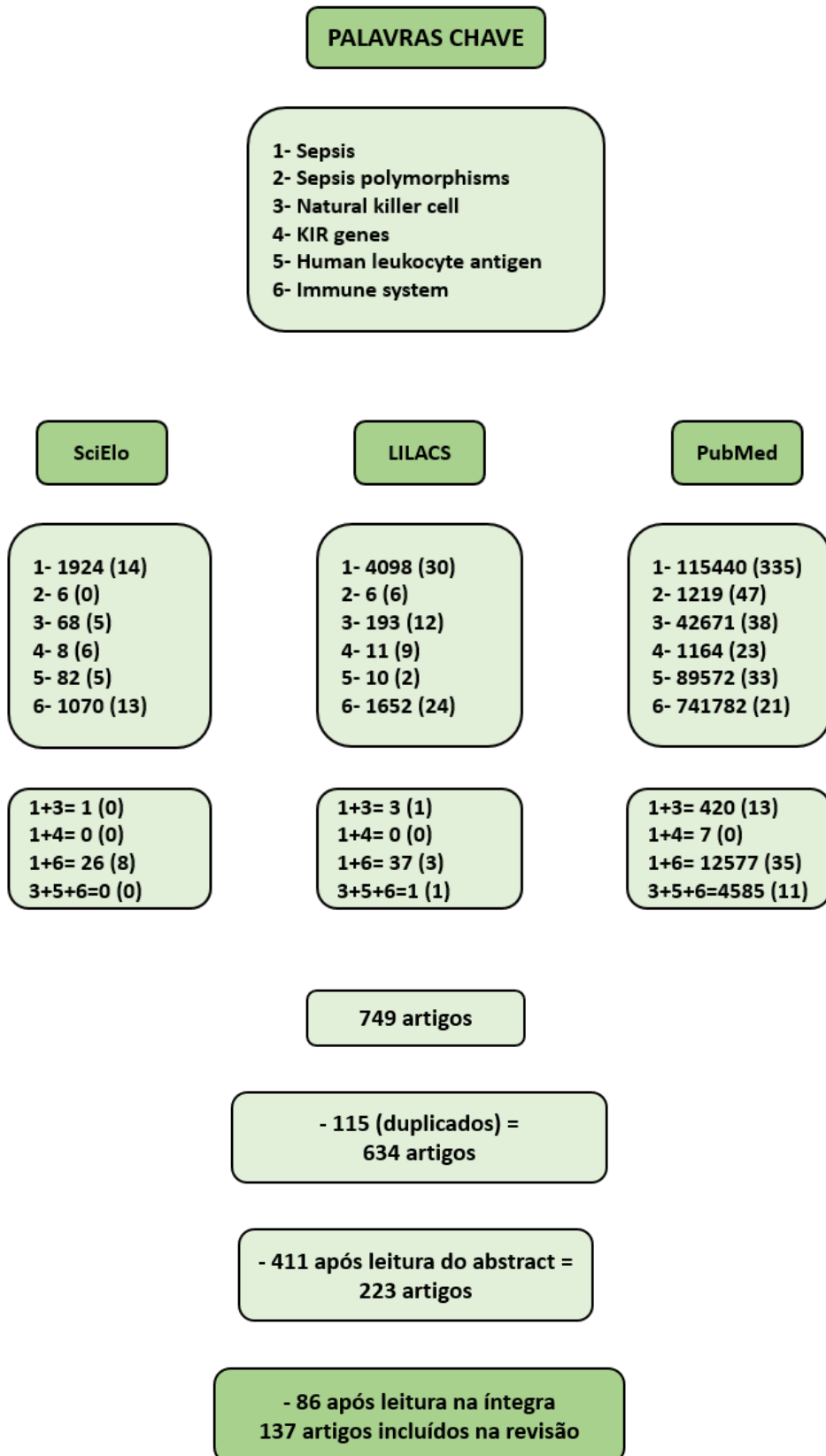


Figura 1: Estratégia de busca de referências bibliográficas. O número de referências selecionadas está entre parênteses.

Ainda, foi incluído um artigo anterior a este período, 1985, que se trata da publicação da Escala de Glasgow, utilizada como parâmetro parcial para cálculo do escore prognóstico na sepse APACHE II. Também foram consultados os *websites* da Associação de Medicina Intensiva Brasileira e do Instituto Latino-Americano de Sepse, em busca de dados brasileiros e latino-americanos sobre aspectos epidemiológicos da sepse, sendo incluídas duas referências, totalizando as 140 apresentadas nesta revisão.

2.2. SEPSE

2.2.1. BREVE HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA DA SEPSE

Uma das mais antigas síndromes descritas na medicina, sepse deriva do grego ὄψιζ e refere-se à decomposição de material orgânico na presença de bactérias. O termo sepse foi utilizado pela primeira vez em um contexto de saúde nos poemas de Homero, há mais de 2700 anos, no uso do termo “sepo”, que significa putrefação. O termo também é encontrado nos escritos de Hipócrates, em 400 a.C., ali entendido como a situação onde há desequilíbrio dos humores, levando a um estado de decadência biológica perigosa e fétida: *“quando a febre é contínua, a superfície externa do corpo está fria, e existe internamente uma grande sensação de calor e sede, a afecção é mortal”*. Com a confirmação da teoria dos microorganismos proposta por Semmelweis, Pasteur e outros, sepse foi redefinida como um estado de infecção sistêmica, muitas vezes descrita como "envenenamento do sangue", e resultado da invasão do hospedeiro por organismos patogênicos que, em seguida, espalhar-se-iam na corrente sanguínea (15-16).

A sepse é uma condição de alta prevalência em todo o mundo (17-33), constituindo, portanto, um tema de interesse em saúde pública. Angus e colaboradores publicaram, em 2001, o primeiro estudo populacional sobre sepse, e neste realizaram projeções que estimaram um aumento de incidência

entre 1,5 e 8% ao ano. Assumindo o crescimento anual de casos no limite inferior da projeção, de 1,5%, chegaríamos a 1.110.000 casos no ano de 2020, somente nos Estados Unidos (EUA) (1). Nos EUA, a sepse apresenta uma densidade de 436 para cada 100.000 habitantes (33), e é a causa de 2% das internações hospitalares; destes pacientes, metade necessita de internação em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), e representam 10% de todas as internações em UTI (1, 20, 34).

O cuidado com pacientes com sepse consome cerca de metade dos recursos financeiros da UTI (33-36), e dois terços dos recursos hospitalares, em função da utilização de tecnologias sofisticadas de suporte à vida (37). A diária de UTI para pacientes com sepse, em países desenvolvidos, é de aproximadamente EUR\$ 1200,00 (38), e o custo de internação atingiu seu pico em 2011, com US\$ 57.987,00. O período médio de internação é de uma semana (33).

É a maior causa de morte em pacientes críticos (35), e uma das principais causas de mortalidade hospitalar tardia (39). Demonstrou-se que a mortalidade por sepse pode variar, e que esta depende de diversos fatores que incluem a gravidade da sepse, sua idade, co-morbidades e tempo de internação (1). A mortalidade por sepse no mundo é maior que a mortalidade por acidente vascular central e infarto do miocárdio. Com o aumento da expectativa de vida das populações, pode-se prever que a mortalidade por sepse aumente ainda mais (40-41). Ainda, há a consciência crescente de que o paciente sobrevivente à sepse frequentemente apresenta problemas cognitivos, físicos e psicológicos a longo prazo, que comprometem a saúde do indivíduo e acarretam custos pessoais e sociais após a alta (42).

A mortalidade na sepse diminui com sua identificação precoce, identificação de fatores de risco, uso de antimicrobianos adequados e em tempo oportuno e, no caso de choque séptico, com o emprego de ressuscitação apropriada (43). Dados epidemiológicos americanos atuais mostram que a mortalidade da sepse, estimada por Angus em 28-80% em 2001 (1), diminuiu para 22,2% em 2008 e 17,3% em 2012. Embora as taxas de mortalidade venham diminuindo, o número de casos aumenta a cada ano, sendo que um terço dos pacientes, aqueles com três ou mais órgãos em disfunção, contribuem para 2/3 dos óbitos (33).

Sabe-se que existem diferenças importantes na epidemiologia, morbidade e mortalidade por sepse no mundo. No Brasil, de acordo com dados do relatório de 2015 do Instituto Latino-Americano de Sepse (ILAS), a sepse é responsável pela ocupação de pelo menos 25% dos leitos das UTI brasileiras, e a mortalidade média geral entre os anos de 2005 e 2015 por sepse grave foi de 29,47%, enquanto que por choque séptico foi de 64,43% (44-45). A sepse é a principal geradora de custos nos setores público e privado, pela necessidade de equipe especializada para seu tratamento e de suporte à vida. Dados do *Brazilian Sepsis Epidemiological Studies (BASES)* apontam que em 2003 aconteceram 398.000 casos e 227.000 mortes por choque séptico no Brasil, com alocação de cerca de R\$ 17,34 bilhões ao tratamento, com diferenças importantes em mortalidade e alocação de recursos entre os sistemas público e privado (3). Enquanto países em desenvolvimento investem entre US\$ 26 e 38 mil no tratamento de um paciente com sepse, no Brasil, o investimento está estimado em US\$ 9,6 mil (45).

2.2.2. DEFINIÇÃO E DIAGNÓSTICO DE SEPSE

Em relação à patofisiologia e sintomatologia, pode-se afirmar que a sepse é uma das condições mais heterogêneas em terapia intensiva. Apesar de sua alta prevalência, nenhum teste foi desenvolvido para diagnosticar sepse ou detectar sua instalação; o diagnóstico de sepse é realizado, portanto, a partir de um conjunto de sinais e sintomas característicos, porém inespecíficos, o que pode dificultar sua realização com acurácia (46).

2.2.2.1. PRIMEIRO CONSENSO DE SEPSE

Até o início dos anos 90, uma série de termos era utilizada para descrever sepse, como septicemia, síndrome séptica, infecção generalizada. Uma vez que a superposição de termos poderia levar a erros diagnósticos, uma definição de sepse foi proposta em 1991 e publicada em 1992 pelo American College of Chest Physicians, em colaboração com a Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM). De acordo com este Primeiro Consenso de Sepse, esta foi definida, de modo geral, como uma resposta inflamatória sistêmica (SIRS, do inglês *systemic inflammatory response syndrome*) secundária a um processo infeccioso estabelecido (47), conforme Figura 2.

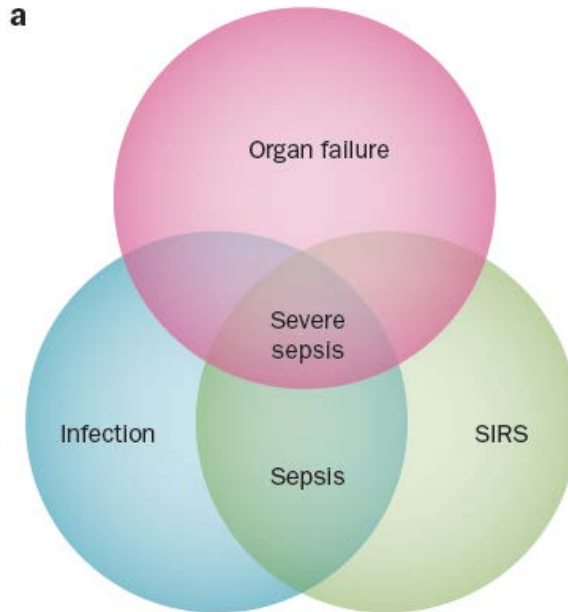


Figura 2: Relação entre infecção, SIRS, disfunção orgânica, sepse e sepse grave, de acordo com o Primeiro Consenso de Sepse. Neste modelo inicial, sepse é um estado inflamatório secundário a um processo infeccioso, enquanto sepse grave é acompanhada por SIRS e disfunção orgânica. Figura de Drewry & Hotchkiss, 2015 (46).

Ainda, para o diagnóstico de sepse, o paciente deveria apresentar ao menos duas das seguintes alterações fisiológicas: temperatura corporal superior a 38°C ou inferior a 36°C; frequência cardíaca superior a 90 batimentos por minuto; frequência respiratória superior a 20 movimentos respiratórios por minuto; leucócitos em número superior a 12.000 células por mm³ ou inferior a 4.000 células por mm³ (47). Esta definição serviu de base para os critérios de sepse elaborados posteriormente e permitiu avanços no

diagnóstico adequado de sepse, bem como sido utilizada na pesquisa clínica em sepse, como critério de inclusão para seleção de pacientes.

2.2.2.2. SEGUNDO CONSENSO DE SEPSE

Após a adoção do Primeiro Consenso de Sepse, percebeu-se algumas limitações na prática clínica das UTI. Muitos pacientes com sepse, embora apresentassem foco infeccioso, não apresentavam manifestações claras de SIRS, o que acreditava-se levar ao sub-diagnóstico de sepse grave (4, 48). Esta baixa sensibilidade do critério diagnóstico demonstrou a necessidade de revisão dos critérios diagnósticos para sepse, o que levou à publicação, em 2013, da atualização do Consenso de Sepse, que define a condição como a presença, provável ou documentada, de infecção, acompanhada de manifestações sistêmicas de SIRS (20,34). Esta modificação foi importante, uma vez que os sinais de infecção podem ser sutis, e as manifestações clínicas altamente variáveis durante a sepse, dependendo tanto do sítio inicial da infecção, quanto do micro-organismo causador, do estado de saúde basal do paciente, do intervalo entre o início da sepse e seu diagnóstico e do tratamento selecionado. É importante destacar que, de acordo com o Segundo Consenso de Sepse, não há ênfase no tradicional critério de SIRS para diagnóstico de sepse grave, conforme representado na Figura 3 (46).

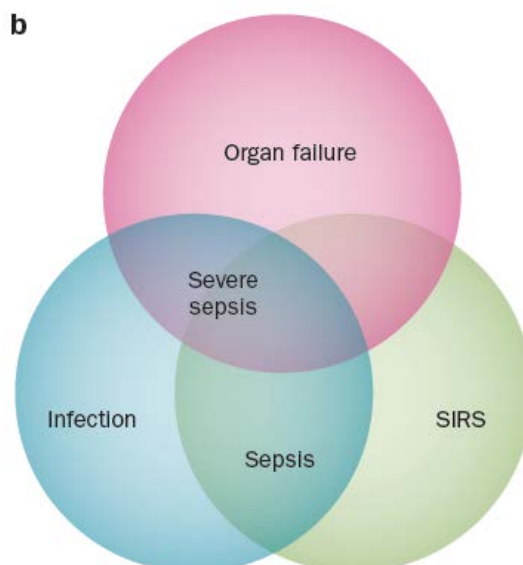


Figura 3: Relação entre infecção, SIRS, disfunção orgânica sepse e sepse grave, de acordo com o Segundo Consenso de Sepse. Neste modelo, sepse é um estado inflamatório secundário a um processo infeccioso, enquanto sepse grave é acompanhada por disfunção orgânica e pode estar acompanhada ou não de SIRS. Figura de Drewry & Hotchkiss, 2015 (46).

Ainda, no Segundo Consenso, sepse grave é definida pela presença de sepse acompanhada de disfunção orgânica em ao menos um órgão e hipoperfusão. Choque séptico caracteriza-se pela sepse grave acompanhada de hipoperfusão, com demanda o uso sustentado de fármacos vasopressores (20,34,49). Os sinais e sintomas para diagnóstico de sepse e sepse grave considerados no Segundo Consenso estão descritos nas Tabelas 1 e 2:

Infecção documentada ou suspeita e um ou mais dos seguintes:*Variáveis gerais:*

- Febre (temperatura > 38,3°C)
- Hipotermia (temperatura < 36°C)
- Frequência cardíaca elevada (> 90 bpm/min ou 2 dp acima do limite superior normal para a idade)
- Taquipnéia
- Estado mental alterado
- Edema substancial ou balanço hídrico positivo (> 20mL/kg em 24h)
- Hiperglicemia (glicose plasmática > 140mg/dL ou 7,7 mmol/L em não diabéticos)

Variáveis inflamatórias:

- Leucocitose (leucócitos em número > 12.000/mL)
- Leucopenia (leucócitos em número < 4.000/mL)
- Leucócitos em número normal, mas com contagem de formas jovens > 10%
- Proteína C-reativa plasmática aumentada (2 sd acima do limite superior)
- Procalcitonina plasmática elevada (2 sd acima do limite superior)

Variáveis hemodinâmicas:

- Hipotensão arterial (pressão arterial sistólica < 90 mmHg, pressão arterial média < 70 mmHg, ou diminuição na pressão arterial sistólica em > 40 mmHg em adultos ou menos que 2 dp abaixo da idade)

Variáveis de disfunção orgânica:

- Hipoxemia arterial ($Pa_{O_2} / Fi_{O_2} < 300$)
- Oligúria aguda (produção de urina < 0,5 mL/kg/h por pelo menos 2h, apesar de uso de ressuscitação volumétrica)
- Aumento da creatinina > 0,5 mg/dL ou 44,2 μ mol/L
- Anormalidades na coagulação (INR > 1,5 ou aTTP > 60s)
- Íleo paralítico (ausência de ruídos hidroaéreos)
- Trombocitopenia (plaquetas < 100.000/ μ L)
- Hiperbilirrubinemia (bilirrubina total plasmática > 4 mg/dL ou 70 μ mol/L)

Variáveis de perfusão tecidual:

- Hiperlactatemia (> 1 mmol/L)
- Diminuição do preenchimento capilar e moteamento cutâneo

Tabela 1: Critérios diagnósticos para sepse. Caracteriza-se sepse quando há a presença documentada ou suspeita de infecção, e ao menos uma das alterações fisiológicas descritas. Adaptado de Dellinger, 2013 (34).

Diagnóstico de sepse e presença de hipoperfusão tecidual ou disfunção orgânica

- Hipotensão causada pela sepse
- Lactato acima dos valores laboratoriais normais
- Produção de urina < 0,5 mL/kg/h por mais de 2h, apesar de uso de ressuscitação volumétrica
- Dano pulmonar agudo com $Pa_{O_2}/Fi_{O_2} < 250$ na ausência de pneumonia ou < 200 na presença de pneumonia
- Creatinina > 2,0 mg/dL (ou 176,8 μ mol/L)
- Bilirrubina superior a 2mg/dL (ou 34,2 μ mol/L)
- Plaquetas inferiores a 100.000 μ L
- Coagulopatia (INR > 1,5)

Tabela 2: Critérios diagnósticos para sepse grave. Caracteriza-se sepse grave quando diagnóstico de sepse e presença de hipoperfusão tecidual ou

disfunção orgânica, caracterizadas por ao menos um dos sintomas descritos. Adaptado de Dellinger, 2013 (34).

O aumento no entendimento da fisiopatologia da sepse demonstra que não é possível definir a doença apenas como um estado hiper-inflamatório. No estabelecimento da sepse pacientes inicialmente apresentam respostas pró e anti-inflamatórias, e muitos demonstram sinais de imunidade inata e celular prejudicadas, e a predominância de uma resposta hipo ou hiper-imune pode variar entre pacientes, dependendo de fatores relacionados ao microorganismo infeccioso e ao hospedeiro. Com a modificação dos critérios de SIRS, a incidência de sepse aumenta, quando comparado aos critérios adotados em 1992 (49), por incluir pacientes que não apresentavam manifestações claras de SIRS como, por exemplo, pacientes idosos.

2.2.2.3. TERCEIRO CONSENSO DE SEPSE OU SEPSIS-3

Entretanto, no início de 2016, foram publicadas no *Journal of American Medical Association* (JAMA) as novas definições de sepse, iniciativa da *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) e da *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM). Novamente, um grupo de especialistas formou uma força

de trabalho propondo novas definições para sepse e choque séptico, desta vez motivados pelo aumento da sofisticação de modalidades disponíveis em países desenvolvidos para o suporte às disfunções orgânicas, como ventilação mecânica e métodos de substituição renal (diálise), terapias que poderiam ser oferecidas em outros espaços que não as UTI, reduzindo custos hospitalares (50-52). Ainda, conforme editorial publicado pelo JAMA em janeiro deste ano, os mecanismos patofisiológicos da sepse hoje são melhor compreendidos, o que acelerou a necessidade por melhores critérios para o seu diagnóstico, considerando a necessidade de triagem de pacientes para que possam ingressar em ensaios clínicos usando terapias específicas, direcionadas a alvos moleculares. De acordo com o Terceiro Consenso de Sepse, as modificações nos critérios de sepse foram (52):

- a) Sepse: disfunção orgânica que ameaça à vida, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção. A infecção deve ser suspeita ou documentada, e acompanhada de aumento agudo de ≥ 2 pontos no *quick SOFA* (do inglês *Sequential Organ Failure Assessment*, apresentado a seguir no item “SOFA e *qSOFA*”).
- b) O conceito de “sepse grave” é suprimido, uma vez que se aceita que todo paciente com sepse é um paciente grave;
- c) Choque séptico: sepse com anormalidades circulatórias e celulares/metabólicas, que sejam profundas o suficiente para produzir aumento no risco de mortalidade. Caracterizada pela necessidade de

uso de vasopressores para elevar a pressão arterial média em \geq 65mmHg, e pelo lactato superior a 2 mmol/L (ou 18mg/dL) após reposição volumétrica adequada.

Portanto, a partir do Terceiro Consenso de Sepsis, define-se a doença como uma resposta multifacetada do hospedeiro a um patógeno que pode estar significativamente ampliada por fatores endógenos, envolvendo ativação precoce de respostas pró e anti-inflamatórias, acompanhada de grandes modificações nos sistemas cardiovascular, neuronal, autonômico, hormonal, metabólico e coagulação, todos estes com significância prognóstica (52).

O ILAS foi convidado, previamente à publicação, a ler o documento contendo as novas definições de sepsis e a endossá-lo; no entanto, recusaram-se a tal, juntamente com outras entidades médicas, como o ACCP e a *American College of Emergency Physicians (ACEP)*. As razões para a recusa são, de forma resumida (44):

- a) Catorze *experts* constituíram o grupo de panelistas, todos pertencentes a países de desenvolvidos. O ILAS considerou inadequado que países conhecidos como de baixos e médios recursos (LMIC, do inglês *low and middle income countries*) não tenham tido direito a representação neste grupo de trabalho.

- b) Os novos conceitos limitam os critérios para definir disfunção orgânica (a partir do *qSOFA*) e, conseqüentemente, diagnosticarão como sépticos apenas os pacientes mais gravemente doentes. Por exemplo, um paciente somente com hipotensão ou Glasgow menor que 13 não seria classificado como séptico com os novos critérios. Isso pode ser interessante para os países mais privilegiados, hoje sofrendo com excesso de sensibilidade, mas vai contra os interesses dos LMIC, onde se tem trabalhado no sentido de aumentar percepção para o problema, onde esta é subdiagnosticada.

- c) O ILAS discorda da necessidade de aguardar a ocorrência de dois critérios do *qSOFA* para determinar o início de conduta, o que poderia aumentar a mortalidade nos LMIC por tardar o diagnóstico.

- d) Níveis elevados de lactato, um importante marcador de acidose e para a definição do choque séptico, não fazem mais parte dos critérios de disfunção orgânica que definem sepse, assumindo que pacientes sem hipotensão e com hiperlactatemia não tem maior risco de morte. A presença de ambas as variáveis aumenta claramente o risco de morte, mas o ILAS considera que ambos sejam fatores de risco independentes.

Face o exposto, percebe-se que os critérios diagnósticos e de classificação de sepse ainda não constituem uma unanimidade, e é possível imaginar que este tema será assunto de debate nos próximos anos.

2.2.3. AVALIAÇÃO DE GRAVIDADE E PROGNÓSTICO DO PACIENTE COM SEPSE

2.2.3.1. SEPSIS-RELATED ORGAN FAILURE ASSESMENT (SOFA)

O escore Sepsis-related Organ failure Assesment, ou SOFA, descreve o grau de disfunção orgânica diário do paciente crítico considerando seis sistemas orgânicos (respiratório, renal, hepático, cardiovascular, hematológico e neurológico), quantificado na escala de zero a quatro. O valor zero representa a função normal e mortalidade esperada na UTI inferior a 5%, enquanto o valor 4 representa disfunção orgânica grave, associado à mortalidade esperada na UTI igual ou superior a 50%. O SOFA-dia refere-se ao somatório dos valores inferidos para cada um dos seis sistemas avaliados no dia indicado, de acordo com a Tabela 3. (53).

SOFA	1	2	3	4
Respiratório: PaO ₂ /FiO ₂ mmHg	<400	<300	<200 Com suporte ventilatório	<100
Coagulação: Plaquetas x 10 ³ /mm ³	<150	<100	<50	<20
Hepático: Bilirrubinas, mg/dL (μmol/L)	1,2-1,9 (20-32)	2,0-5,9 (33-101)	6,0-11,9 (102-204)	>12 (>204)
Cardiovascular: Hipotensão	PAM < 70mmHg	Dopamina ≤5 ou dobutamina (qualquer dose)	Dopamina >5 ou epinefrina ≤0,1 ou norepinefrina ≤0,1	Dopamina >15 ou epinefrina >0,1 ou norepinefrina >0,1
SNC: Escala de Glasgow	13-14	10-12	6-9	<6
Renal: Creatinina, mg/dL (μmol/L) ou débito urinário	1,2-1,9 (110-170)	2,0-3,4 (171-299)	3,5-4,9 (300-440) ou < 500mL/dia	>5 (>440) ou < 200mL/dia

Tabela 3: Escore SOFA. Este escore considera alterações em seis órgãos ou sistemas: respiratório, cardíaco, renal, cardiovascular, sistema

nervoso central e sistema de coagulação. Pontos de zero a quatro são atribuídos conforme resultados obtidos em exames laboratoriais e após a aplicação da Escala de Glasgow, onde zero indica função orgânica normal e quatro o valor máximo atribuído à disfunção orgânica. Agentes adrenérgicos administrados por ao menos uma hora, em taxas de $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$. PAM: pressão arterial média. SNC: sistema nervoso central. Adaptado de Vincent, 1996 (53).

É importante destacar que o SOFA não é um escore preditivo, mas apenas descritivo. O escore SOFA-1 é o escore da disfunção orgânica do dia da admissão do paciente, isto é, descreve a gravidade do indivíduo nas primeiras 24 horas após a admissão na UTI (53).

Já o *qSOFA* é um novo escore publicado em conjunto ao Terceiro Consenso de Sepsis para pacientes adultos que se baseia em apenas em três parâmetros: frequência respiratória, alteração do estado mental e pressão sistólica, conforme Tabela 4. A presença de quaisquer dois dos três parâmetros é capaz de prever sepse. O *qSOFA* apresenta algumas vantagens sobre o SOFA como a ausência de necessidade de exames laboratoriais para seu cálculo, rapidez e repetibilidade, porém é menos robusto (52).

<i>qSOFA</i>	
Parâmetro	Valor
Frequência respiratória	$\geq 22/\text{min}$
Alteração do status mental	presente
Pressão arterial sistólica	$\leq 100\text{mmHg}$

Tabela 4: Escore *qSOFA*. Este escore considera alterações em três órgãos ou sistemas: respiratório, cardiovascular e sistema nervoso central.

Quando a alteração está presente, independentemente de seu valor, atribui-se um ponto. A presença de dois dos três pontos é sensível para predizer sepse. Adaptado de Singer, 2016 (53).

2.2.3.2. APACHE II

O índice APACHE II (do inglês *Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II*) é escore aplicado nas primeiras 24 horas de internação e que estima a probabilidade de óbito do paciente que chega à UTI, ou seja, é um escore preditivo. Considera valores dos parâmetros temperatura, pressão arterial média, frequências cardíaca e respiratória, oxigenação, pH arterial, sódio e potássio séricos, creatinina, hematócrito e leucometria, e a escala de Glasgow, conforme Figura 4 (54).

PHYSIOLOGIC VARIABLE	HIGH ABNORMAL RANGE					LOW ABNORMAL RANGE				
	+4	+3	+2	+1	0	+1	+2	+3	+4	
TEMPERATURE — rectal (°C)	≥ 41*	39*.40.9*		38.5*.38.9*	36*.38.4*	34*.35.9*	32*.33.9*	30*.31.9*	≤ 29.9*	
MEAN ARTERIAL PRESSURE — mm Hg	≥ 180	130-159	110-129		70-109		50-69		≤ 49	
HEART RATE (ventricular response)	≥ 180	140-179	110-139		70-109		55-69	40-54	≤ 39	
RESPIRATORY RATE — (non-ventilated or ventilated)	≥ 50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		≤ 5	
OXYGENATION: A-aDO ₂ or PaO ₂ (mm Hg)										
a. FIO ₂ ≥ 0.5 record A-aDO ₂	≥ 500	350-499	200-349		< 200					
b. FIO ₂ < 0.5 record only PaO ₂					PO ₂ > 70	PO ₂ 61-70		PO ₂ 55-60	PO ₂ < 55	
ARTERIAL pH	≥ 7.7	7.6-7.69		7.5-7.59	7.33-7.49		7.25-7.32	7.15-7.24	< 7.15	
SERUM SODIUM (mMol/L)	≥ 180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	≤ 110	
SERUM POTASSIUM (mMol/L)	≥ 7	6-6.9		5.5-5.9	3.5-5.4	3-3.4	2.5-2.9		< 2.5	
SERUM CREATININE (mg/100 ml) (Double point score for acute renal failure)	≥ 3.5	2-3.4	1.5-1.9		0.6-1.4		< 0.6			
HEMATOCRIT (%)	≥ 60		50-59.9	46-49.9	30-45.9		20-29.9		< 20	
WHITE BLOOD COUNT (total/mm ³) (in 1,000s)	≥ 40		20-39.9	15-19.9	3-14.9		1-2.9		< 1	
GLASGOW COMA SCORE (GCS): Score = 15 minus actual GCS										
A Total ACUTE PHYSIOLOGY SCORE (APS): Sum of the 12 individual variable points										
Serum HCO ₃ (venous-mMol/L) [Not preferred, use if no ABGs]	≥ 52	41-51.9		32-40.9	22-31.9		18-21.9	15-17.9	< 15	

B AGE POINTS:
Assign points to age as follows:

AGE(yrs)	Points
≤ 44	0
45-54	2
55-64	3
65-74	5
≥ 75	6

C CHRONIC HEALTH POINTS

If the patient has a history of severe organ system insufficiency or is immuno-compromised assign points as follows:

- for nonoperative or emergency postoperative patients — 5 points
- or
- for elective postoperative patients — 2 points

DEFINITIONS

Organ Insufficiency or immuno-compromised state must have been evident prior to this hospital admission and conform to the following criteria:

LIVER: Biopsy proven cirrhosis and documented portal hypertension; episodes of past upper GI bleeding attributed to portal hypertension; or prior episodes of hepatic failure/encephalopathy/coma.

CARDIOVASCULAR: New York Heart Association Class IV.

RESPIRATORY: Chronic restrictive, obstructive, or vascular disease resulting in severe exercise restriction, i.e., unable to climb stairs or perform household duties; or documented chronic hypoxia, hypercapnia, secondary polycythemia, severe pulmonary hypertension (>40mmHg), or respirator dependency.

RENAL: Receiving chronic dialysis.

IMMUNO-COMPROMISED: The patient has received therapy that suppresses resistance to infection, e.g., immuno-suppression, chemotherapy, radiation, long term or recent high dose steroids, or has a disease that is sufficiently advanced to suppress resistance to infection, e.g., leukemia, lymphoma, AIDS.

APACHE II SCORE

Sum of **A** + **B** + **C**

A APS points

B Age points

C Chronic Health points

Total APACHE II

Figura 4: Escore APACHE II e os respectivos valores pontuados conforme disfunção em órgãos e sistemas. Este escore considera valores dos parâmetros temperatura, pressão arterial média, frequências cardíaca e respiratória, oxigenação, pH arterial, sódio e potássio séricos, creatinina, hematócrito e leucometria, e a escala de Glasgow (54).

Normalmente, na prática clínica diária, utiliza-se *software* ou *sites* da *web* que calculam este índice automaticamente. A partir do somatório obtido classifica-se a gravidade do paciente, e o conseqüente risco de morte em 28 dias na UTI, conforme Figura 5. Pode ser utilizado para estratificar pacientes de acordo com a gravidade da doença e o prognóstico; acompanhar a evolução e

resposta à terapêutica; avaliar o desempenho da UTI e compará-lo com o de outras unidades; comparar a mortalidade hospitalar observada com a esperada; avaliar indiretamente o custo/benefício de determinados procedimentos.

APACHE II Score	Mortalidade aproximada
0-4	4%
5-9	8%
10-14	15%
15-19	25%
20-24	40%
25-29	55%
30-34	75%
>34	85%

Figura 5: Risco de morte em 28 dias na UTI a partir do Escore APACHE II (54).

2.2.4. FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

A teoria que propõe que a disfunção orgânica e mortalidade na sepse é causada por um estímulo excessivo do sistema imune advém de estudos em modelos animais, onde a infusão de bactérias ou produtos de bactérias, em especial lipopolissacarídeos, em animais de experimentação, resulta em uma forte ativação de diferentes cascatas de proteínas pró-inflamatórias que,

embora ocorra para proteger o hospedeiro da infecção por agentes invasores, pode causar dano tecidual quando em proporções maiores (55).

A inflamação é, portanto, uma resposta fisiológica adequada a um processo infeccioso. O sistema imune inato é capaz de detectar patógenos através de um número limitado de receptores reconhedores de padrão (PRR, do inglês *pattern-recognition receptors*). PRR reconhecem motivos expressos pelos patógenos, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMP, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*). Exemplos de PAMP em bactérias são lipopolissacarídeos (LPS), expressos em bactérias Gram-negativas, peptidoglicano, lipopeptídeos, ácido lipotecóico, flagelina e DNA bacteriano. PRR também reconhecem mediadores endógenos que são liberados após dano, chamados de alarminas (56-57).

Ao considerarmos uma infecção por Gram-negativos, por exemplo, a resposta inflamatória se inicia após a interação do LPS com o PPR tipo Toll, e ativa uma série de eventos intracelulares que culmina com a ativação do (NFkB, do inglês *factor nuclear kappa B*) e, por conseqüência, ativação de genes relacionados à produção de mediadores pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do inglês *tumor necrosis fator alpha*), as interleucinas 1 e 6 (IL-1, IL-6) e o fator ativador plaquetário (PAF, do inglês *platelet activator factor*). Esses mediadores apresentam múltiplos efeitos a fim de reparar danos já existentes e prevenir novas lesões teciduais, através da ativação de outras células, como células Natural Killer (NK), levando à amplificação da resposta inflamatória. Para assegurar que os efeitos dos mediadores pró-inflamatórios não se tornem destrutivos, também são liberados

mediadores anti-inflamatórios, como as interleucinas 4 e 10 (IL-4, IL-10), que normalmente promovem um processo de *downregulation* sobre a resposta pró-inflamatória inicial. Na sepse, esse controle da resposta inicial à infecção é superado, ocorrendo uma reação sistêmica exacerbada e extremamente danosa. O excesso dos mediadores inflamatórios, TNF- α e IL-1, provoca uma resposta fisiológica inadequada e interfere na função normal tecidual, levando ao dano celular e à disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (DMOS), conforme Figura 6 (50, 55, 58-60).

Após dano causado pelo processo infeccioso, ocorre dano tecidual, associado a liberação de alarminas, ou padrões moleculares associados ao perigo (DAMP, do inglês *danger-associated molecular patterns*), que são fatores que amplificam a resposta inflamatória, além da cascata de coagulação e da agregação plaquetária, ocasionando coagulopatia e trombocitopenia. Esse processo pode progredir, levando a coagulação intravascular disseminada (CIVD). A cascata de coagulação amplifica o processo inflamatório através da geração de trombina, e esse processo leva a CIVD. A trombose microvascular está fortemente ligada ao desenvolvimento da DMOS (50, 55, 58-60).

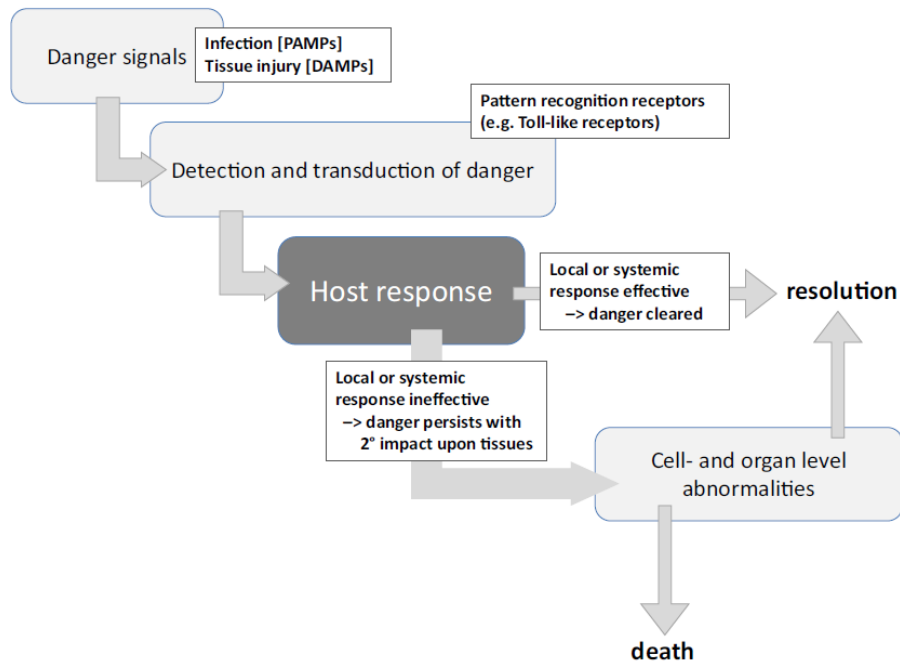


Figura 6: Modelo de disfunção orgânica provocada pelo estímulo do sistema imune. Sinais de perigo, como PAMPs e DAMPs, são reconhecidos por receptores celulares que amplificam a resposta inflamatória. Se a resposta é efetiva, há a resolução do processo infeccioso; se não, há aumento do impacto sobre órgãos e tecidos, produzindo anormalidades celulares e teciduais que levam ao óbito. PAMPs: do inglês *pathogen-associated molecular patterns*. DAMPs: do inglês *danger-associated molecular patterns*. Fonte: Shankar, 2015 (50).

Portanto, a sepse é um potente ativador do sistema imune, inflamatório, e da cascata de coagulação do hospedeiro, que ocorre através de mecanismos complexos e a ativação de uma série de intermediários bioquímicos. Estes três sistemas estão intimamente relacionados; por exemplo, quando há produção de citocinas, há ativação de trombina, que estimula o sistema de coagulação; a

ativação da cascata de coagulação leva à geração de trombina, que a sua vez atua como um potente pró-inflamatório, funcionando como um feedback positivo (61-66).

Fatores de risco para sepse estão relacionados com a predisposição do paciente para infecções e, se a infecção se desenvolve, a intensidade da resposta à infecção e a probabilidade de disfunção orgânica. Existem muitos fatores de risco conhecidos para infecção que podem precipitar a sepse e o choque séptico. Doenças crônicas, como síndrome de imunodeficiência adquirida, doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência cardíaca, doenças isquêmicas e cânceres, e o uso de medicamentos imunossupressores são alguns dos fatores clínicos (1). Gênero, idade e etnia também são determinantes: pessoas do gênero masculino, em extremos de idade e afro descendentes estão em maior risco (1, 67). O micro-organismo causador, condição de saúde basal, disfunção orgânica pré-existente, além das intervenções terapêuticas recebidas durante a internação também são determinantes (68).

Fatores genéticos que predisponham o paciente à infecção e o curso desta tem sido considerados como determinantes de gravidade e mortalidade (69). Embora o sentido geral da ativação do sistema imune, da inflamação e da cascata de coagulação sejam comuns a todos os indivíduos, existem diferenças interindividuais importantes na resposta à infecção, que podem representar implicações clínicas importantes (70, 71). Isto parece ser verdadeiro também para a sepse, visto que um grande número de estudos buscou associar a presença de polimorfismos genéticos com a suscetibilidade

à sepse e ao choque séptico, à severidade e mortalidade na doença. Neste tópico, serão apresentados alguns destes estudos.

Mira e colaboradores identificaram, em 1999, que polimorfismos no TNF- α estavam associados com susceptibilidade ao choque séptico e mortalidade na sepse (72), resultado corroborado por estudo que posteriormente associou a prevalência do genótipo TNF- α -308 G/A com sepse em pacientes pós-operatórios (73). Pacientes com o alelo rs1800629 A para TNF- α apresentariam, ainda, maior risco para sepse induzida por pneumonia (74).

Acredita-se que variabilidade genética em outras citocinas inflamatórias, como interleucinas, contribuam para fenótipos clínicos diferentes, onde pacientes críticos com maior prevalência de determinadas variações em interleucinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e IL-13, teriam proteção contra sepse e mortalidade (75). Foi demonstrado que pacientes que carregam o alelo rs1800795 C para IL-6, uma interleucina anti-inflamatória (74), apresentam maior risco para sepse causada por pneumonia. Polimorfismos em outras interleucinas, como IL-1 (76) IL-21 (77) também estão associadas com maior risco de sepse; polimorfismos em IL-18 estão associados a maior mortalidade na sepse (78).

Receptores do tipo Toll (TLR, do inglês *Toll like receptors*) também apresentam polimorfismos associados a risco de sepse, especialmente para pacientes de ancestralidade europeia (79), além de menor tempo para o estabelecimento da sepse grave ou choque séptico em pacientes internados em ITU (80), falência renal, hepática e do sistema de coagulação (81). O imunorreceptor Fc γ RIIA (CD32A), que se liga à proteína C reativa, uma

importante opsonina em processos inflamatórios, também pode apresentar polimorfismos que parecem estar associados à susceptibilidade à sepse (82). Receptores para produtos de glicação avançada (RAGE, do inglês *receptor for advanced glycation end products*) são um dos principais tipos de receptores reconhecedores de padrão, que desempenham um papel importante na sepse, também podem apresentar polimorfismos que estão associados com a incidência de sepse e sepse grave (83).

Variações polimórficas em intermediários da cascata de coagulação e seus ativadores também parecem estar envolvidos na sepse. Observou-se que polimorfismo no gene para o inibidor-1 da ativação do plasminogênio, (PAI-1, do inglês *plasminogen activator inhibitor-1*) parece determinar níveis séricos de PAI-1 e ser um fator determinante de sepse em pacientes queimados (84). Variações genéticas para o gene do fator tecidual estão associados com maior prevalência de sepse grave (85). Ainda, variações em enzimas antioxidantes como glutathione peroxidase (GPx, do inglês *glutathione peroxidase*), que atua de forma cooperativa com a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) estão associados à mortalidade na sepse (86).

Estes são apenas alguns dos diversos polimorfismos genéticos já estudados na sepse, que sugerem que variações genéticas no hospedeiro influenciem na incidência e desfechos na doença. Nosso conhecimento de determinantes-chave da complexa resposta inflamatória do hospedeiro ainda é limitado. Reconhecer os mecanismos pelos quais respostas adaptativas se tornam deletérias e identificar fatores genéticos que possam estar implicados é imperativo para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas pertinentes, para identificar e triar pacientes em maior risco e estimar prognóstico, bem

como utilizar terapias profiláticas em pacientes de alto risco para sepse e evitar terapias de com alta incidência de efeitos adversos em pacientes de baixo risco (71).

2.3. CÉLULAS NATURAL KILLER

2.3.1. O SISTEMA IMUNOLÓGICO E O PAPEL DAS CÉLULAS NATURAL KILLER

O sistema imunológico é formado por uma rede complexa de componentes humorais e celulares que distinguem o que é próprio (*self*) do não-próprio (*non-self*). Quando este sistema funciona de modo adequado, pode eliminar patógenos e células tumorais, além de células transplantadas (87).

As células *Natural Killer* (NK) foram primeiramente identificadas como uma subpopulação de células imunes capazes de lisar células tumorais *in vitro*, sem imunização prévia do hospedeiro. Fazem parte da imunidade inata e compreendem cerca de 10-20% dos linfócitos circulantes. Primordialmente presentes no sangue, baço, fígado pulmões, medula óssea e no útero gravídico, com número limitado nos linfonodos. Têm grande importância na vigilância imunológica, pois disparam, às vezes em poucas horas, uma resposta efetora contra agentes invasores, como vírus e bactérias, ao contrário de células do sistema imunológico adaptativo, que tendem a gerar respostas mais lentas (88-92).

Morfologicamente, são maiores que linfócitos T e B, exibindo citoplasma granular e marcadores de superfície CD16 e CD56 (87, 90, 91). Em seres

humanos, a maioria das células NK são células CD56+CD3-, porém, nem todas são exterminadoras efetivas; 90% das células NK sanguíneas são CD56^{low}, ou seja, possuem baixa expressão de CD56, contém grânulos citotóxicos e são exterminadoras eficazes. Dez por cento das células NK são CD56^{hi}, não possuem grânulos citotóxicos mas podem responder às células alvo, como bactérias, por produção de INF- γ , limitando a infecção. As células presentes em linfonodos, fígado e pulmões são menos citotóxicas que as NK CD16^{low} sanguíneas (88, 92).

São células timo-independentes, que exercem função citotóxica através da secreção de fatores solúveis como TNF- α , interferon γ (INF- γ , do qual é a maior fonte), e outras citocinas e quimiocinas. Linfocinas como interferon α (INF- α), interferon β (INF- β), e interleucinas 2, 12 e 18 (IL-2, IL-12, IL-18) produzidas por fagócitos, como macrófagos e células dendríticas (DC, do inglês *dendritic cells*), também são capazes de ativar células NK; enquanto INF- α e INF- β promovem os efeitos citotóxicos, IL-12 estimula a produção de citocinas, como INF- γ , criando um *feedback* positivo e amplificando a resposta imunológica através da ativação de macrófagos e maturação de DC, que passam a secretar linfocinas. Estas, ativam por sua vez linfócitos T, conforme Figura 7 (88-91). Estas interações recíprocas entre NK e DC ocorrem *in vitro* e *in vivo*, porém o local onde ocorre esta interação *in vivo* permanece indeterminada. Uma das possibilidades é que ocorra nos sítios de inflamação, onde DC residentes imaturas são encontradas e NK migram em resposta à inflamação. Outra possibilidade é a de que NK entrem em contato com DC maduras nos linfonodos, oriundas dos sítios de infecção e/ou inflamação (90).

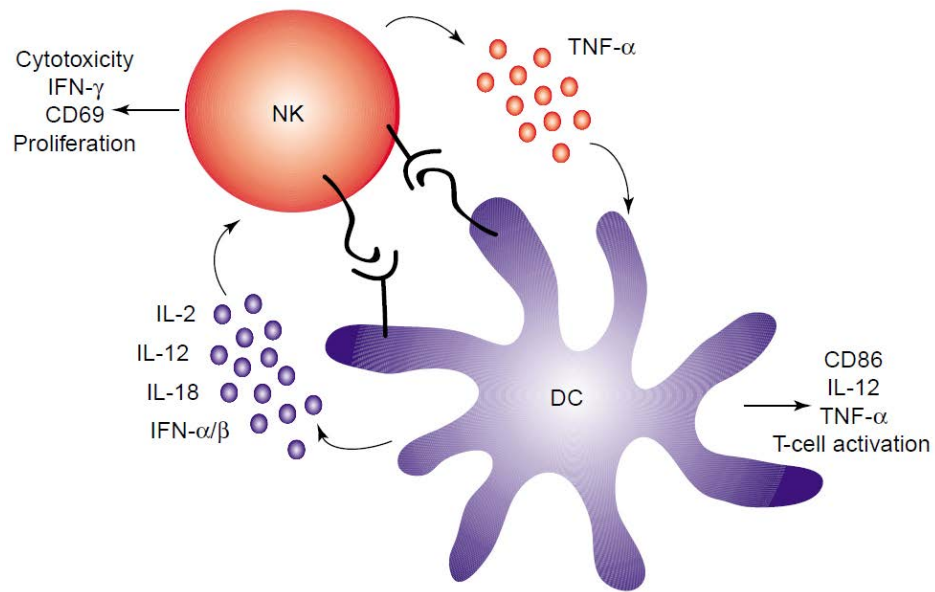


Figura 7: Relação entre NK e DC. NK e DC possuem a capacidade de ativar uma a outra de forma recíproca, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Esta interação envolve mediadores químicos produzidos por ambas as células, resultando na ativação de NK, com proliferação e produção de citocinas, que levam à maturação de DC e produzem citocinas capazes de ativar linfócitos T. Acredita-se que a interação entre NK e DC ocorra nos sítios de inflamação. Figura de Hamerman, 2005 (90).

Ainda, NK fazem parte do sistema imune adaptativo; além de estimular a maturação de DC, eliminam DC imaturas, ativam monócitos e células T citotóxicas, e regulam a ativação e proliferação de células T através de interação celular direta (contato). Estimulam linfócitos B a secretar

imunoglobulinas e influenciam a polarização de T *helper*, conforme Figura 8 (93).

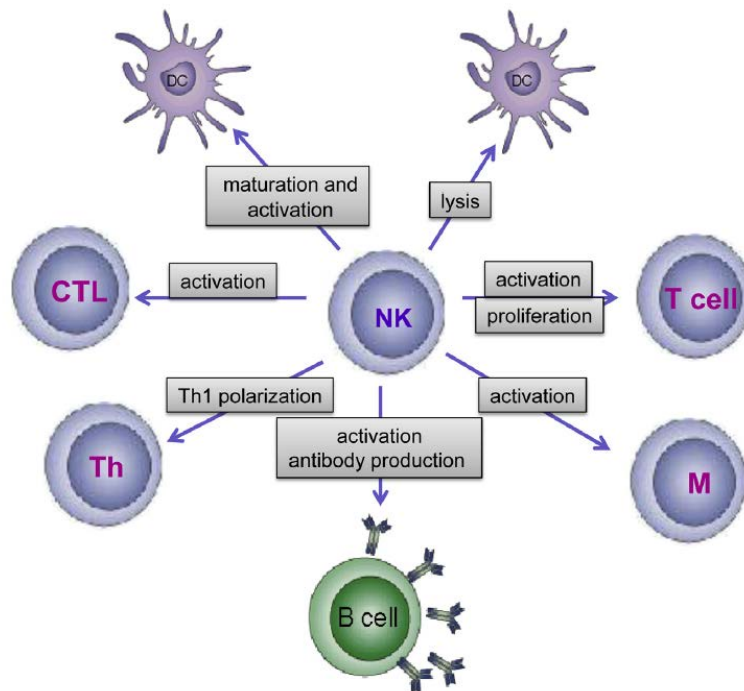


Figura 8: Funções de células NK. As células NK desempenham um papel importante na imunidade inata e adaptativa. Elas estimulam a maturação de células dendríticas (DC) e eliminam as imaturas. Estão envolvidas na ativação de monócitos (representadas em M) e células T citotóxicas (representadas em CTL), além de regular a ativação e proliferação de células T (representadas em T cell) através de contato celular direto. Ainda, produzem citocinas que influenciam na polarização de células T helper (representadas em Th). Células NK ativadas são capazes de estimular linfócitos B (representadas em B cells) a produzir imunoglobulinas. Figura de Deniz, 2013 (93).

Deste modo, células NK podem rapidamente ser ativadas e atacar células anormais; portanto, indivíduos com deficiência de NK, uma condição rara, sofrem com infecções virais persistentes, particularmente causadas por herpes vírus, e possuem incidência aumentada de tumores (88, 91, 94, 95).

2.3.2. RECEPTORES DE NK

Para ter tolerância ao tecido sadio e, ainda, atacar células anormais, a atividade de NK deve ser estreitamente regulada. Pesquisas durante as duas décadas passadas focaram na identificação de um grande número de receptores e efetores de superfície em células NK, que são as estruturas celulares utilizadas para reconhecimento e destruição de células-alvo, com tolerância ao *self* (90). Atualmente, a atenção volta-se a determinar qual o papel de células NK *in vivo* na imunidade inata e sua contribuição para o sistema imune adaptativo.

Moléculas de Classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC-I, do inglês *major histocompatibility molecules class I*), em especial moléculas do antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês *human leukocyte antigen*) participam deste reconhecimento. Células NK reconhecem células infecciosas, anormais ou transplantadas através da interação de seus receptores específicos, que identificam a ausência de moléculas HLA nas superfícies celulares. A vigilância imunológica de NK depende da concentração

apropriada e específica de HLA nas células-alvo; resumidamente, a melhor caracterização para o mecanismo de ativação de NK é a identificação da ausência de *self*. Células normais do organismo apresentam níveis abundantes de moléculas MHC-I em toda sua superfície, que são reconhecidas pelos receptores inibitórios de NK e geram um sinal suprimindo a ativação, prevenindo a lise celular. No entanto, quando são encontradas células que não expressam MHC-I (como bactérias e células transplantadas), ou que tenham perdido a sua expressão (no caso de tumores e infecções virais), os receptores inibitórios não são recrutados, e sinais de ativação não suprimidos disparam um ataque ao alvo 96-105), conforme Figura 9.

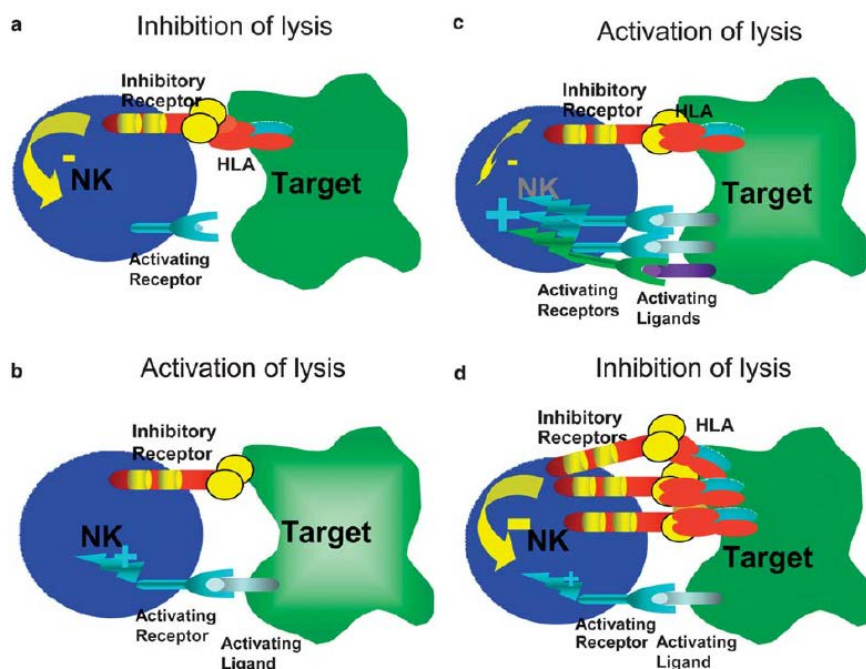


Figura 9: Relação entre NK e célula-alvo, de acordo com a ausência ou presença de ligantes HLA. A resposta de NK é regulada por um balanço de

sinais de receptores ativadores e inibidores. (a) Na ausência de uma interação receptor ativador/ligante, a lise celular é inibida quando receptores inibidores (KIR) se ligam a HLA-I conhecidos na membrana da célula-alvo. (b) A lise ocorre quando receptores ativadores se ligam a alvos celulares na ausência de interação de receptores inibitórios com HLA-I. (c) A interação entre o receptor ativador e seu ligante predomina sobre a ligação do receptor inibidor e HLA-I, promovendo a lise da célula-alvo; (d) Predominância de interação do receptor inibidor e HLA-I sobre a interação entre receptor ativador e ligante, resultando em um sinal negativo, prevenindo a lise da célula-alvo. Fonte Fehniger, 2003 (89).

Aceita-se hoje que células NK também possam ser ativadas e tornar-se citotóxicas pela expressão exagerada de ligantes para receptores de ativação na superfície da célula-alvo. Nesta perspectiva, a vigilância epidemiológica pode se dar tanto pela diminuição da expressão de HLA das células alvo quanto por um desequilíbrio entre os sinais ativadores e inibitórios mediados pelos receptores de NK (87).

2.3.2.1. RECEPTORES KIR

As funções efetoras de células NK são reguladas por pelo menos dois receptores estruturalmente diferentes que interagem com moléculas HLA de classe I: receptores inibitórios tipo lectina C (CLIR, do inglês *C-type lectin inhibitory receptors*) e uma superfamília de receptores tipo imunoglobulina (107). A esta última incluem-se os receptores conhecidos como KIR, do inglês *killer cell immunoglobulin-like receptors*, que são estruturas proteicas expressas por um grupo de genes identificados como genes *KIR* (91, 106).

Receptores KIR tem sido estudados na última década a partir da descoberta da sua aplicação na imunoterapia do câncer. Eles existem como receptores inibitórios e excitatórios que primordialmente reconhecem moléculas de HLA-A, -B e -C (107). Estão presentes na maioria das células NK CD56^{low}, sendo que cada célula exibe uma seleção aleatória de KIR (88).

A nomenclatura de KIR é baseada na sua estrutura básica proteica intra e extracelular, conforme Figura 10. Possuem dois ou três domínios extracelulares de imunoglobulinas-*like* extracelulares (2D ou 3D) responsáveis pelo reconhecimento de HLA-A, B ou C. Ainda, possuem cauda intracitoplasmática (CIT), que pode ser curta (S, do inglês *short*) ou longa (L, do inglês *long*), e uma porção transmembrana (TM) (89).

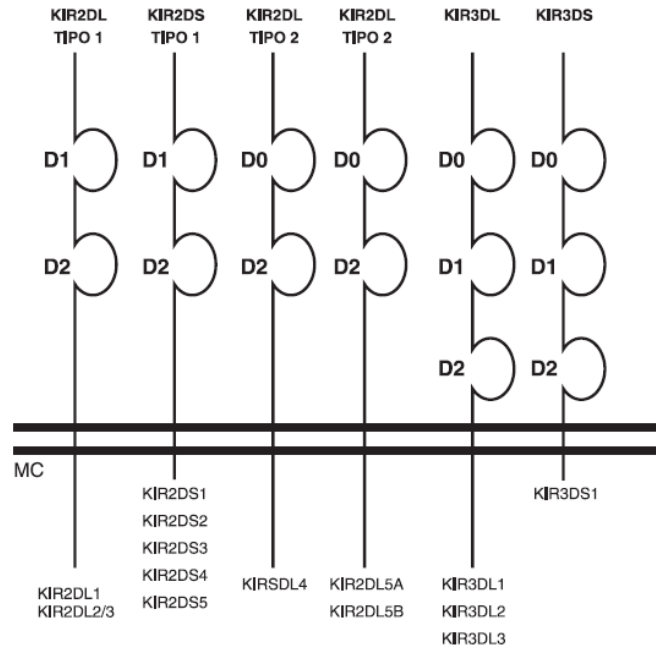


Figura 10: Receptores KIR na membrana celular. KIR possui dois ou três domínios extracelulares, representados por D0, D1 e D2 (110), e possuem cauda citoplasmática curta (S) ou longa (L), o que define se a molécula é ativadora (S) ou inibidora (L). Fonte: Wilson, 1997 (109).

As porções CIT e TM predizem atividade funcional; as com caudas curtas são ativadoras, e as longas são inibidoras, com exceção de KIR2DL4. Os receptores das células NK que possuem cadeias citoplasmáticas curtas medeiam sinais ativadores através da sua interação com o DAP-12 (adaptador da molécula), que contém motivos moleculares ativadores do imunorreceptor baseados em tirosina (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs* – ITAMs). A cadeia citoplasmática longa (caracterizado pela letra “L”) tem 2 motivos moleculares inibitórios do imunorreceptor baseados em tirosina

(*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs* – ITIMs) que iniciam a inibição das células NK pelo recrutamento de fosfatases da tirosina (89).

Os receptores KIR são resultado da expressão de um sistema genético polimórfico. Ao contrário de linfócitos B e T, células NK não se submetem a rearranjo genético para gerar o repertório de receptores celulares, mas utilizam receptores inibidores e ativadores codificados de modo germinativo (104). Até o momento foram descobertos 15 genes (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR3DS1) e 2 pseudogenes (KIR2DP1 e KIR3DP1) (108-110), localizados em uma região de cerca de 150 Kb do complexo de receptores leucocitários (LCR, do inglês *leukocyte complex receptors*) no cromossomo 19q13.4 (111). Os genes KIR apresentam grande similaridade molecular entre si e são derivados de um gene ancestral por uma série de duplicações, recombinações e mutações. A estrutura básica dos genes KIR é de uma unidade de nove éxons que representa o gene ancestral (103)

Cook e colaboradores caracterizaram, em 2003, 100 genótipos diferentes na população mundial (112). Trinta e dois genótipos foram encontrados em uma população de caucasoides brasileiros; os dois genótipos mais comuns apresentam frequência de 24 e 13,8% (87), que também foram os mais prevalentes no estudo internacional.

As populações caucasoides brasileira, inglesa e argentina apresentam frequências bastante semelhantes dos genes KIR; porém, outras populações, como chineses, japoneses e indígenas do México e Argentina, apresentam em baixa frequência o alelo KIR2DS3, ou mesmo não o apresentam. Já em

aborígenes australianos, sua frequência é superior a 80%. Em populações caucasoides, sua frequência é intermediária. Existem diferenças em outras populações, demonstrando que o polimorfismo genético existe para esses marcadores e permitindo antecipar diferenças de resposta imune inata entre populações (113-120).

2.3.3. DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA DE KIR

Genes KIR são herdados em bloco ou haplótipos. Da mesma forma que genes KIR, os haplótipos estão distribuídos em diferentes frequências nas populações. Os mais prevalentes são haplótipo A e haplótipo B. Os haplótipos A e B estão distribuídos de modo semelhante nas populações caucasoides, sem prevalência de A ou B; já em populações orientais, como chineses, japonese e coreanos, a prevalência de haplótipos A é de 75%, enquanto apenas 13% em aborígenes australianos (118-121). A manutenção do haplótipos ocorre através de seleção por balanceamento, indicando seu papel essencial para sobrevivência a longo prazo (122).

O haplótipo A é definido pela presença dos genes inibitórios KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR3DL1, KIR3DL2 KIR3DL3, e apenas um gene ativador, KIR2DS4. Já o haplótipo B é mais variável e caracterizado pela presença de mais de um gene ativador. Os genes KIR2DL4, KIR3DL2 e KIR3DL3 são chamados genes de “moldura” (ou *framework genes*) e presentes em ambos

haplótipos, conforme Figura 11 (110, 123). Embora se saiba que existe uma série de outros haplótipos, a literatura fala basicamente dos mais prevalentes, o “A” e o “B” (16). Não há reatividade de NK contra células autólogas em condições normais, portanto, nesta situação, mesmo células NK que não expressam receptores inibitórios são pouco responsivas e relativamente tolerantes (124).

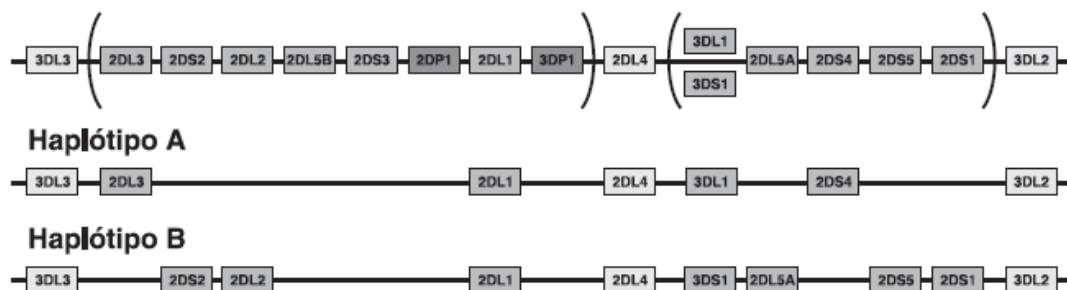


Figura 11: Haplótipos A e B. Haplótipo A é definido pela presença de apenas um gene ativador, KIR2DS4. Haplótipo B é mais variável e caracterizado pela presença de mais de um gene ativador. Os genes KIR2DL4, KIR3DL2 e KIR3DL3 estão presentes em ambos haplótipos. Fonte: Jobim & Jobim, 2008 (87).

2.3.4. LIGANTES DOS RECEPTORES KIR

Os ligantes para receptores KIR são as moléculas HLA de classe I (HLA-A, B e C), e as ligações ocorrem conforme a Tabela 5. Não existe um tipo de KIR específico para cada molécula MHC-I; cada conjunto de KIR reconhece porções determinantes compartilhadas por um grupo de moléculas MHC-I. Além disso, a correspondência entre KIR e muitos alelos HLA-A e HLA-B não existe. Enquanto KIR são específicos para um número de moléculas MHC-I, HLA-C é o isotipo predominantemente envolvido na regulação inibitória de NK em humanos, oferecendo proteção contra lise e produção de citocinas (89).

Receptor KIR	Ligante específico
KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS2	Grupo 1 (HLA Cw1, 3, 7, 8)
KIR2DL1, KIR2DS1	Grupo 2 (HLA Cw2, 4, 5, 6)
KIR3DL2	HLA-A03, A 11
KIR3DL1	Bw4

Tabela 5: Receptores KIR e seus ligantes específicos. Os receptores KIR2DL2, KIR2DL3 e KIR2DS2 reconhecem algumas moléculas HLA-C, identificadas como Grupo 1 (HLA-C1). Já receptores KIR2DL1 e KIR2DS1 reconhecem o Grupo 2 (HLA-C2). KIR3DL1 interage com moléculas HLA-B quando sorologicamente forem Bw4. O bloco HLA-A divide-se em A3 e A11, e interage com KIR3DL2. Adaptado de Jobim & Jobim, 2008 (87).

Os receptores KIR2DL2, KIR2DL3 e KIR2DS3 reconhecem algumas moléculas HLA-C, identificadas como Grupo 1 (HLA-C1). Já receptores

KIR2DL1 e KIR2DS1 reconhecem o Grupo 2 (HLA-C2). Os grupos 1 e 2 são distintos por um dimorfismo na posição 80 na hélice α -1 da molécula HLA-C (125). As duas formas são caracterizadas pela presença de Ser77/Asn80 e Asn77/Lys80 para HLA-C1 e HLA-C2 respectivamente, sendo a ligação KIR2DL1-C2 mais forte que a ligação KIR2DL3-C1 (87).

O bloco HLA-B pode ser dividido em Bw4 e Bw6. KIR3DL1 interage com moléculas HLA-B quando sorologicamente forem Bw4; se estas apresentarem Ile80, ocorre a maior inibição. Interações de alta afinidade com Bw6 não são conhecidas. O bloco HLA-A divide-se em A3 e A11, e interage com KIR3DL2 (87).

2.3.5. INFLUÊNCIA DE KIR NO CURSO DE DOENÇAS

Diversos estudos em humanos tem demonstrado o papel de KIR na aquisição e curso de doenças, principalmente no controle de infecções virais. Associação entre alelos particulares e desfechos foram encontrados em diferentes condições clínicas.

Durante a infecção por HIV-1, por exemplo, há uma expansão de células NK 3DS1+ e, em menor grau de células 3DL1+, dependente do epítotope Bw4-80I (126, 127). A expansão de subconjuntos de células NK selecionadas pode ser benéfica ao hospedeiro; a ativação do alelo 3DS1 na presença de alelos

HLA-B está associada a uma progressão mais lenta de síndrome da imunodeficiência humana adquirida (SIDA) e menor número de cópias virais no sangue (127, 128), embora não exista evidência direta de ligação entre KIR3DS1 e moléculas HLA-Bw4 (129-133). Pacientes 3DL1+ mas HLA-BW4-, bem como pacientes 2DL1+ e HLA-C2- foram maiores em pacientes críticos quando comparados a controles sadios ou pacientes com reações menores a H1N1 (134)

Células NK positivas para os genes inibitórios 2DL2 e 2DL3 aumentam a degranulação quando respondem a células infectadas por vírus da hepatite C, ao ligarem-se em epítopes HLA-C1 (135), sendo que a ligação entre HLA-C1 e 2DL2 é mais forte que com 2DL3 (136). Indivíduos homocigotos para 2DL3-C1 controlam melhor a infecção e podem, inclusive, eliminar o vírus de forma espontânea (13). A homocigose para 2DL3-C1 resulta em maior ativação de NK na influenza (137).

O papel de genes KIR também foi estudado em doenças auto-imunes. A baixa expressão de 3DL1 na superfície de NK, na presença do epítotope HLA-Bw4 está associada com um aumento de risco para o desenvolvimento de psoríase (138). Este resultado é consistente com o modelo que propõe que a redução do sinal inibidor resulta em uma resposta auto-imune aumentada (139).

Ainda, há evidências de associação entre a co-expressão de KIR2DS1 e HLA-C2 em mulheres com abortamento recorrente (140) e diversas publicações que focam na relação entre polimorfismos de KIR e transplante de células hematopoiéticas, outras doenças como diabetes, esclerodermia (13-17)

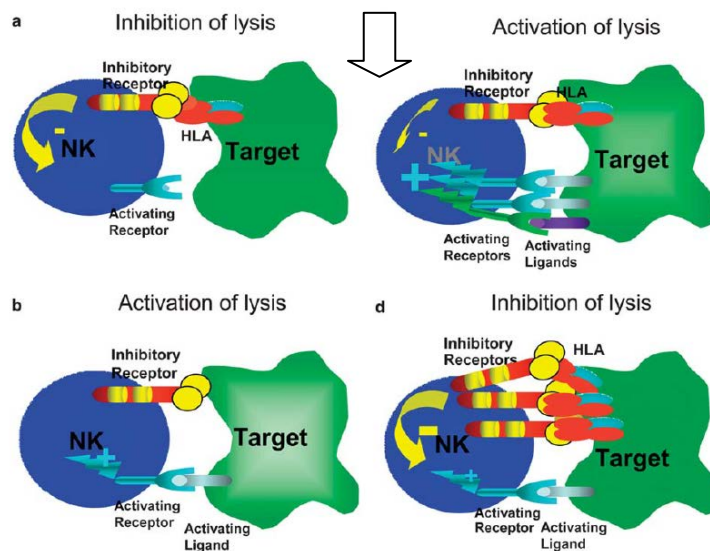
mas até então não são conhecidas publicações que focam na expressão de KIR e suscetibilidade à sepse.

2.4. MARCO TEÓRICO

As células NK possuem habilidade de reconhecer a células normais pela expressão do HLA de classe I, que interage com receptores KIR, gerando sinais inibitórios.

I

Quando a expressão do HLA de classe I está diminuída ou ausente, como no caso de células bacterianas, sinais excitatórios são produzidos, estimulando a cascata inflamatória e levando a célula invasora à morte.



II



Considerando que a sepse é uma doença infecciosa caracterizada pela por uma resposta desregulada do hospedeiro à esta infecção, a ausência e a presença dos receptores KIR podem estar relacionadas na patogênese da sepse, por diminuir ou aumentar atividade da célula NK.

3. JUSTIFICATIVA PARA REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO

Pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) são apresentados quadro clínico crítico e complexo decorrente de fragilidades fisiológicas graves. A sepse está relacionada com a permanência prolongada destes pacientes na unidade e com a evolução da severidade da disfunção de órgãos, resultando no aumento da morbimortalidade. Desde a década de 80 tem se demonstrado que a suscetibilidade à infecção tem bases herdadas. Este estudo tem por objetivo avaliar a prevalência de genes *KIR* e seus ligantes HLA em uma população de pacientes críticos de uma UTI do sul do Brasil e verificar se há associação destes genes com a sepse, de acordo com critérios estabelecidos no Segundo Consenso de Sepse, e seus desfechos.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a prevalência de receptores KIR e seus respectivos ligantes HLA de classe I em pacientes com sepse, comparando-a com pacientes críticos oriundos da mesma UTI, buscando associações com desfechos.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar a prevalência e descrever os receptores KIR na sepse;
- b. Determinar se a expressão de receptores KIR influencia na susceptibilidade à sepse;
- c. Determinar a prevalência e descrever os ligantes HLA de classe I na sepse;
- d. Determinar se a expressão de receptores KIR e seus ligantes HLA de classe I determina desfechos na sepse, como disfunção e falência orgânica, gravidade, mortalidade na UTI e mortalidade hospitalar;

- e. Determinar se a variabilidade haplotípica determina desfechos na sepse, como disfunção e falência orgânica, gravidade, mortalidade na UTI e mortalidade hospitalar.

5. REFERÊNCIAS

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
2. Riedemann NC, Guo R, Ward PA: The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 2003; 112: 460-467
3. Silva E, Pedro MDA, Sogayar ACB, et al.: Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care* 2004; 8: R251–60
4. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al.: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 2003; 29: 530–538
5. Esmon CT: The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol* 2005; 131: 417–430
6. Faust SN, Heyderman RS, Levin M: Coagulation in severe sepsis: a central role for thrombomodulin and activated protein C. *Crit Care Med* 2001; 29: S62–68
7. Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348: 138–150
8. Jagneaux T, Taylor DE, Kantrow SP: Coagulation in sepsis. *Am J Med Sci* 2004; 328: 196–204
9. Levi M, Keller TT, van Gorp E, et al.: Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res* 2003; 60: 26–39
10. Marshall JC: Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of

- multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 2001; 29: S99–106
11. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, et al.: Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 536–545
 12. Park C: Otimização de metodologia para o estudo de genes KIR. *J Bras Patol Med Lab*, 2010; 215–224
 13. Romero V, Azocar J, Zúñiga J, et al.: Class II alleles in Hepatitis C Virus infection outcome. *Mol Immunol*, 2009; 45: 2429–2436
 14. Moretta L, Locatelli F, Pende D, et al.: Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2011; 117: 764–771
 15. Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A: Sepsis and septic shock: a history. *Crit Care Clin* 2009; 25: 83–101
 16. Majno G: The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). *J Infect Dis* 1991; 163: 937–945
 17. Angus DC, van der Poll T: Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013; 369: 840–851
 18. Chittawatanarat K, Jaikriengkrai K, Permpikul C: Survey of respiratory support for intensive care patients in 10 tertiary hospital of Thailand. *J Med Assoc Thai* 2014; 97: S8–14
 19. Ogura H, Gando S, Saitoh D, et al.: Epidemiology of severe sepsis in Japanese intensive care units: A prospective multicenter study. *J Infect Chemother* 2014; 20: 157–162
 20. van Gestel A, Bakker J, Veraart CPWM, et al.: Prevalence and

- incidence of severe sepsis in Dutch intensive care units. *Crit Care* 2004; 8: R153–R162
21. Engel C, Brunkhorst FM, Bone H, et al.: Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 2007; 33: 606–618
 22. Vesteynsdottir E, Karason S, Sigurdsson SE, et al.: Severe sepsis and septic shock: a prospective population-based study in Icelandic intensive care units. *Acta Anaesthesiol Scand* 2011; 55: 722–731
 23. Záhorec R, Firment J, Straková J, et al.: Epidemiology of severe sepsis in intensive care units in the Slovak Republic. *Infection* 2005; 33: 122–128
 24. Blanco J, Muriel-Bombin A, Sagredo V, et al.: Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Crit Care* 2008; 12: R158
 25. Schlapbach LJ, Straney L, Alexander J, et al.: Mortality related to invasive infections, sepsis, and septic shock in critically ill children in Australia and New Zealand, 2002-13: A multicentre retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 2015; 15: 46–54
 26. Finfer S, Bellomo R, Lipman J, et al.: Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units. *Intensive Care Med* 2004; 30: 589–596
 27. Sakr Y, Elia C, Mascia L, et al.: Epidemiology and outcome of sepsis syndromes in Italian ICUs: a multicentre, observational cohort study in the region of Piedmont. *Minerva Anesthesiol* 2013; 79: 993–1002
 28. Baharoon S, Telmesani A, Tamim H, et al.: Community- versus

- nosocomial-acquired severe sepsis and septic shock in patients admitted to a tertiary intensive care in Saudi Arabia, etiology and outcome. *J Infect Public Health* 8: 418–24
29. Karlsson S, Varpula M, Ruokonen E, et al.: Incidence, treatment, and outcome of severe sepsis in ICU-treated adults in Finland: The Finnsepsis study. *Intensive Care Med* 2007; 33: 435–443
 30. Stoller J, Halpin L, Weis M, et al.: Epidemiology of severe sepsis: 2008-2012. *J Crit Care* 2015; 31: 58–62
 31. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al.: Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock, 2012. *Intensive Care Med* 2013; 39: 165–228
 32. Lagu T, Rothberg MB, Shieh M-S, et al.: Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Crit Care Med* 2012; 40: 754–761
 33. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, et al.: Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med* 2007; 35: 1244–1250
 34. Khwannimit B, Bhurayanontachai R: The direct costs of intensive care management and risk factors for financial burden of patients with severe sepsis and septic shock. *J Crit Care* 2015; 30: 929–934
 35. Burchardi H, Schneider H: Economic aspects of severe sepsis: a review of intensive care unit costs, cost of illness and cost effectiveness of therapy. *Pharmacoeconomics* 2004; 22: 793–813

36. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, et al: EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med* 2004; 30: 580–588
37. Wong MD, Shapiro MF, Boscardin WJ, et al.: Contribution of Major Diseases to Disparities in Mortality. *N Engl J Med* 2002; 347: 1585–1592
38. Kumar G, Kumar N, Taneja A, et al.: Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). *Chest* 2011; 140: 1223–1231
39. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, et al.: Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA* 2010; 304: 1787–1794
40. Rivers EP, Abrahamian FM, Moran GJ, et al.: Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines. *Ann Emerg Med*, 2006; 48: 28-54
41. ILAS - Instituto Latino-Americano para Estudos da Sepse. Disponível em: <http://www.ilas.org.br/index.php>. Data de acesso: 22 de janeiro de 2016.
42. ILAS - Instituto Latino-Americano para Estudos da Sepse. Sepse: um problema de saúde pública. Brasília: CFM, 2015.90 p.
43. Drewry AM, Hotchkiss RS: Sepsis: Revising definitions of sepsis. *Nat Rev Nephrol* 2015; 11: 326–328
44. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL: The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992; 101: 1481–1483
45. Kaukonen K-M, Bailey M, Pilcher D, et al.: Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N Engl J Med*

2015; 372: 1629–1638

46. Klouwenberg PMCK, David DS, Bonten MJM, et al.: Classification of sepsis, severe sepsis and septic shock: The impact of minor variations in data capture and definition of SIRS criteria. *Intensive Care Med* 2012; 38: 811–819
47. Shankar-Hari M, Deutschman CS, Singer M: Do we need a new definition of sepsis? *Intensive Care Med* 2015; 41: 909–911
48. Abraham E: New definitions for sepsis and septic shock: Continuing evolution but with much still to be done. *JAMA* 2016; 315: 757–759
49. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al.: The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 801–810
50. Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al.: The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med* 1996; 22: 707–710
51. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, et al.: APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985; 13: 818–829
52. Anas AA, Wiersinga WJ, de Vos AF, et al.: Recent insights into the pathogenesis of bacterial sepsis. *Neth J Med* 2010; 68: 147–152
53. Ishii KJ, Koyama S, Nakagawa A, et al.: Host Innate Immune Receptors and Beyond: Making Sense of Microbial Infections. *Cell Host Microbe* 2008; 3: 352–363
54. van der Poll T, Opal SM: Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 32–43
55. Dixon B: The role of microvascular thrombosis in sepsis. *Anaesth*

- Intensive Care* 2004; 32: 619–629
56. Amaral A, Opal SM, Vincent J-L: Coagulation in sepsis. *Intensive Care Med* 2004; 30: 1032–1040
 57. Vincent J-L, De Backer D: Does disseminated intravascular coagulation lead to multiple organ failure? *Crit Care Clin* 2005; 21: 469–477
 58. Simmons J, Pittet J-F: The coagulopathy of acute sepsis. *Curr Opin Anaesthesiol* 2015; 28: 227–36
 59. Hoppensteadt D, Tsuruta K, Hirman J, et al.: Dysregulation of inflammatory and hemostatic markers in sepsis and suspected disseminated intravascular coagulation. *Clin Appl Thromb Hemost* 2015; 21: 120–127
 60. Okamoto K, Tamura T, Sawatsubashi Y: Sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J Intensive Care* 2016; 4: 23
 61. Hawiger J, Veach RA, Zienkiewicz J: New paradigms in sepsis: from prevention to protection of failing microcirculation. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 1743–1756
 62. Semeraro N, Ammollo CT, Semeraro F, et al.: Coagulopathy of Acute Sepsis. *Semin Thromb Hemost* 2015; 41: 650–658
 63. Allen KS, Sawheny E, Kinasewitz GT: Anticoagulant modulation of inflammation in severe sepsis. *World J Crit Care Med* 2015; 4: 105–115
 64. Mayr FB, Yende S, Linde-Zwirble WT, et al.: Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. *JAMA* 2010; 303: 2495–2503

65. Angus DC, Wax RS: Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* 2001; 29: S109–116
66. Casanova J-L: Human genetic basis of interindividual variability in the course of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: E7118–27
67. Burgner D, Levin M: Genetic susceptibility to infectious diseases. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 1–6
68. Sutherland AM, Walley KR: Bench-to-bedside review: Association of genetic variation with sepsis. *Crit Care* 2009; 13: 210
69. Mira JP, Cariou A, Grall F, et al.: Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 1999; 282: 561–568
70. Baghel K, Srivastava RN, Chandra A, et al.: TNF- α , IL-6, and IL-8 cytokines and their association with TNF- α -308 G/A polymorphism and postoperative sepsis. *J Gastrointest Surg* 2014; 18: 1486–1494
71. Feng B, Mao ZR, Pang K, et al: Association of tumor necrosis factor α -308G/A and interleukin-6 -174G/C gene polymorphism with pneumonia-induced sepsis. *J Crit Care* 2015; 30: 920–923
72. Belopolskaya OB, Smelaya T V, Moroz V V, et al.: Clinical associations of host genetic variations in the genes of cytokines in critically ill patients. *Clin Exp Immunol* 2015; 180: 531–541
73. Zhang A-Q, Pan W, Gao J-W, et al.: Associations between interleukin-1 gene polymorphisms and sepsis risk: a meta-analysis. *BMC Med Genet* 2014; 15: 8
74. Miao T, Pu Y, Zhou B, et al.: Association between polymorphisms in

- IL21 gene and risk for sepsis. *Biomarkers* 2016; 29: 1–5
75. Yamada T, Aoyama-Ishikawa M, Yamashita H, et al.: IL18 production and IL18 promoter polymorphisms correlate with mortality in ICU patients. *In Vivo* 2014; 28: 391–396
76. Gao J, Zhang A, Wang X, et al.: Association between the TLR2 Arg753Gln polymorphism and the risk of sepsis: a meta-analysis. *Crit Care* 2015; 19: 416
77. Nachtigall I, Tamarkin A, Tafelski S, et al.: Polymorphisms of the toll-like receptor 2 and 4 genes are associated with faster progression and a more severe course of sepsis in critically ill patients.. *J Int Med Res* 2014; 42: 93–110
78. Mansur A, von Gruben L, Popov AF, et al.: The regulatory toll-like receptor 4 genetic polymorphism rs11536889 is associated with renal, coagulation and hepatic organ failure in sepsis patients. *J Transl Med* 2014; 12: 177
79. Beppler J, Koehler-Santos P, Pasqualim G, et al.: Fc Gamma Receptor IIA (CD32A) R131 Polymorphism as a Marker of Genetic Susceptibility to Sepsis. *Inflammation* 2015; 39: 518-525.
80. Shao Y, Shao X, He J, et al.: The promoter polymorphisms of receptor for advanced glycation end products were associated with the susceptibility and progression of sepsis. *Clin Genet* 2016 [Epub ahead of print]
81. Chi YF, Chai JK, Yu YM, et al.: Association between PAI-1 polymorphisms and plasma PAI-1 level with sepsis in severely burned patients. *Genet Mol Res* 2015; 14: 10081–10086

82. Shi D, Song Z, Yin J, et al.: Genetic variation in the tissue factor gene is associated with clinical outcome in severe sepsis patients. *Crit Care* 2014; 18: 631
83. Majolo F, Oliveira Paludo FJ de, Ponzoni A, et al.: Effect of 593C>T GPx1 SNP alone and in synergy with 47C>T SOD2 SNP on the outcome of critically ill patients. *Cytokine* 2015; 71: 312–317
84. Jobim M, Jobim LFJ: Natural killer cells and immune surveillance. *J Pediatr (Rio J)* 2008; 84: 58–67
85. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, et al.: CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003; 101: 3052–3057
86. Farag SS, Caligiuri MA: Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev* 2006; 20: 123–137
87. Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL: NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 29–35
88. Parham P: Taking license with natural killer cell maturation and repertoire development. *Immunol Rev* 2006; 214: 155–160
89. Lodoen MB, Lanier LL: Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 391–398
90. Deniz G, Van De Veen W, Akdis M: Natural killer cells in patients with allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132: 527–535
91. Orange JS: Natural killer cell deficiency [Internet]. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132: 515–525
92. Orange JS, Ballas ZK: Natural killer cells in human health and

- disease. *Clin Immunol* 2006; 118: 1–10
93. MacFarlane AW, Campbell KS: Signal transduction in natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 298: 23–57
 94. Bléry M, Olcese L, Vivier E: Early signaling via inhibitory and activating NK receptors. *Hum Immunol* 2000; 61: 51–64
 95. Sola C, André P, Lemmers C, et al.: Genetic and antibody-mediated reprogramming of natural killer cell missing-self recognition in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 12879–12884
 96. Anfossi N, André P, Guia S, et al.: Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I. *Immunity* 2006; 25: 331–342
 97. Stewart CA, Laugier-Anfossi F, Vély F, et al.: Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 13224–13229
 98. Thielens A, Vivier E, Romagné F: NK cell MHC class I specific receptors (KIR): From biology to clinical intervention. *Curr Opin Immunol* 2012; 24: 239–245
 99. Vivier E: What is natural in natural killer cells? *Immunol Lett* 2006; 107: 1–7
 100. André P, Biassoni R, Colonna M, et al.: New nomenclature for MHC receptors. *Nat Immunol* 2001; 2: 661
 101. Carrillo-Bustamante P, Keşmir C, de Boer RJ: The evolution of natural killer cell receptors. *Immunogenetics* 2015; 68: 3–18
 102. Long EO: Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu rev Immunol* 1999; 17: 875–904
 103. Parham P: Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity:

- balancing signals in the natural killer cell response. *Immunol Lett* 2004; 92: 11–3
104. Farag SS, VanDeusen JB, Fehniger TA, et al.: Biology and clinical impact of human natural killer cells. *Int J Hematol* 2003; 78: 7–17
105. Lanier LL: NK Cell Receptors. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 359–393
106. Wilson MJ, Torkar M, Trowsdale J: Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene. *Tissue Antigens* 1997; 49: 574–579
107. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, et al.: The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev* 2002; 190: 40–52
108. Dupont B, Selvakumar A, Steffens U: The killer cell inhibitory receptor genomic region on human chromosome 19q13.4. *Tissue Antigens* 1997; 49: 557–563
109. Cook MA, Norman PJ, Curran MD, et al.: A multi-laboratory characterization of the KIR genotypes of 10th International Histocompatibility Workshop cell lines. *Hum Immunol* 2003; 64: 567–571
110. Jobim M, Jobim LFJ, Salim PH, et al.: A study of the killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 in a Caucasoid Brazilian population with psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens* 2008; 72: 392–396
111. Contreras G, Aláez C, Murguía A, et al.: Distribution of the killer cell immunoglobulin-like receptors in Mexican Mestizos. *Tissue Antigens* 2007; 69: 125–129

112. Flores AC, Marcos CY, Paladino N, et al.: KIR genes polymorphism in Argentinean Caucasoid and Amerindian populations. *Tissue Antigens* 2007; 69: 568–576
113. Gutiérrez-Rodríguez ME, Sandoval-Ramírez L, Díaz-Flores M, et al.: KIR Gene in Ethnic and Mestizo Populations from Mexico. *Hum Immunol* 2006; 67: 85–93
114. Norman PJ, Stephens HA, Verity DH, et al.: Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups. *Immunogenetics* 2001; 52: 195–205
115. Jiang K, Zhu F-M, Lv Q-F, et al.: Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Chinese Han population. *Tissue Antigens* 2005; 65: 556–563
116. Yawata M, Yawata N, McQueen KL, et al.: Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression. *Immunogenetics* 2002; 54: 543–550
117. Toneva M, Lepage V, Lafay G, et al.: Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. *Tissue Antigens* 2001; 57: 358–562
118. Hollenbach JA, Meenagh A, Sleator C, et al.: Report from the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) anthropology component of the 15th international histocompatibility workshop: Worldwide variation in the KIR loci and further evidence for the co-evolution of KIR and HLA. *Tissue Antigens* 2010; 76: 9–17
119. Gendzekhadze K, Norman PJ, Abi-Rached L, et al.: Co-evolution of KIR2DL3 with HLA-C in a human population retaining minimal

- essential diversity of KIR and HLA class I ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 18692–18697
120. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, et al.: Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 1997; 7: 753–63
 121. Shilling HG, Young N, Guethlein LA, et al.: Genetic control of human NK cell repertoire *J Immunol* 2002; 169: 239–247
 122. Cantoni C, Biassoni R: HLA class-I-specific NK receptors belong to two distinct molecular families and display inhibitory or activating function. *Res Immunol* 148:146–150
 123. Alter G, Rihn S, Walter K, et al.: HLA class I subtype-dependent expansion of KIR3DS1+ and KIR3DL1+ NK cells during acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 2009; 83: 6798–6805
 124. Pelak K, Need AC, Fellay J, et al.: Copy number variation of KIR genes influences HIV-1 control. *PLoS Biol* 2011; 9: e1001208
 125. Martin MP, Gao X, Lee J-H, et al.: Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 2002; 31: 429–34
 126. Carr WH, Rosen DB, Arase H, et al.: Cutting Edge: KIR3DS1, a gene implicated in resistance to progression to AIDS, encodes a DAP12-associated receptor expressed on NK cells that triggers NK cell activation. *J Immunol* 2007; 178: 647–651
 127. Gillespie GM a, Bashirova A, Dong T, et al.: Lack of KIR3DS1 binding to MHC class I Bw4 tetramers in complex with CD8+ T cell epitopes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007; 23: 451–455
 128. O'Connor GM, Guinan KJ, Rodat T, et al.: Functional polymorphism

- of the KIR3DL1 / S1 receptor on human NK cells. *J Immunol* 2016; 178: 235-241
129. Saunders PM, Vivian JP, O'Connor GM, et al.: A bird's eye view of NK cell receptor interactions with their MHC class I ligands. *Immunol Rev* 2015; 267: 148–166
130. Khakoo SI, Jamil KM: KIR/HLA interactions and pathogen immunity. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 298348
131. La D, Czarnecki C, El-Gabalawy H, et al.: Enrichment of variations in KIR3DL1/s1 and KIR2DL2/L3 among H1N1/09 ICU patients: An exploratory study. *PLoS One* 2011; 6: e29200
132. Holder KA, Russell RS, Grant MD. Natural killer cell function and dysfunction in hepatitis C virus infection. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 903764
133. Winter CC, Gumperz JE, Parham P, et al.: Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol* 1998; 161: 571–577
134. Ahlenstiel G, Martin MP, Gao X, et al.: Distinct KIR/HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses. *J Clin Invest* 2008; 118: 1017–1026
135. Ahn RS, Moslehi H, Martin MP, et al.: Inhibitory KIR3DL1 alleles are associated with psoriasis. *Br J Dermatol* 2015; 65: 1–3
136. Kulkarni S, Martin MP, Carrington M: The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol* 2008; 20: 343–352
137. Dambaeva S V, Lee DH, Sung N, et al.: Recurrent Pregnancy Loss

in Women with Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor KIR2DS1 is Associated with an Increased HLA-C2 Allelic Frequency. *Am J Reprod Immunol* 2016; 75: 94–103

5. ARTIGO ORIGINAL

Human Immunology

Original Article

Reduced Frequency of Two Activating KIR Genes in Patients with Sepsis

Luciana M. Oliveira, PharmD, MSc^{a,b,c}; Pamela Portela, PhD^b; Joice Merzoni, PharmD^b; Fernando S. Dias, PhD^d; Jaqueline Beppler, PhD^b; Pietra Graebin, MSc^e; Clarice S. Alho, PhD^e; Gilberto Schwartzmann, MD, PhD^{c,f}; Felipe Dal-Pizzol, MD, PhD^{g,h}; Luiz Fernando Jobim, MD, PhD^{b,f}; Mariana Jobim, MD, PhD^b; Rafael Roesler, PhD^{c,i}

^aSchool of Pharmacy, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^bImmunology Service, Porto Alegre Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^cCancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Porto Alegre Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^dIntensive Care Unit, Pompéia Hospital, Caxias do Sul, Brazil.

^eFaculty of Biosciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^fDepartment of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^gExperimental Physiopathology Laboratory, Graduate Program in Health Sciences, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Brazil.

^hIntensive Care Unit, São José Hospital, Criciúma, Brazil.

ⁱDepartment of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author:

Luciana M. Oliveira, Faculty of Pharmacy, Av. Ipiranga, 6681, Prédio 12, Bloco A, sala 202, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: +5551 33203512. E-mail address: oliveirm@gmail.com.

or

Rafael Roesler, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul; Rua Sarmento Leite, 500 (ICBS, Campus Centro/UFRGS), 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +5551 33083183. E-mail address: rafaelroesler@hcpa.edu.br.

ABSTRACT

In sepsis, early activation of immune cells occur, and the imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory pathways leads to organ dysfunction. Sepsis development and severity may be influenced by genetic factors affecting immune response. Natural killer (NK) cells are components of the innate immune system and have their activity regulated through the balance between activating and inhibitory signals transduced by different killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR). Diversity in KIR gene repertoire among individuals might affect disease outcome. We examined sixteen KIR genes and their human leucocyte antigen (HLA) class I ligands in a group of 271 critical patients aiming at the identification of patterns in KIR genotypes and HLA ligands that could be associated with sepsis. Patients from both genders were included, with ages ranging from 14 to 94 years old. DNA samples from 211 patients with sepsis and 60 controls (critical care patients with no sepsis) were analyzed. DNA samples were genotyped for KIR genes using the polymerase chain reaction method with sequence-specific oligonucleotide (PCR-SSO) and for HLA genes using the polymerase chain reaction method with sequence-specific primers (PCR-SSP). There was a lower frequency of activating KIR2DS1 and KIR3DS1 in sepsis group when compared to control group (41.23% *versus* 55.00%, and 36.49% *versus* 51.67%; *p* values of 0.041 and 0.025, respectively). When analyzing these genes for homozygosis and heterozygosis, no difference was found between septic patients and controls; also, no significant results were found for C1, C2, Bw4, A3 and A11 and comparing the inhibitory and activating KIR genes frequencies in the presence

of their ligands. Our study shows, for the first time, that activating KIR genes 2DS1 and 3DS1 are more prevalent in critical patients without sepsis than in patients with sepsis, suggesting a potential prognostic marker and that the presence of activating genes may play a role as a protective factor for sepsis.

Key Words: killer cell immunoglobulin-like receptor; human leukocyte antigen; Natural Killer cell; sepsis

1. Introduction

Sepsis is a common condition in intensive care units (ICUs) worldwide and a major cause of death in critical care patients. The incidence of sepsis increases each year, and its treatment spends about half of the hospitals financial resources [1-5].

Sepsis can be defined as a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection [6]. During sepsis, early activation of immune cells occurs, and the imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory pathways culminate in organ dysfunction. The number of organs in dysfunction characterize the severity of the disease, and is a risk factor for death [7]. Precise mechanisms by which sepsis produces an uncontrolled inflammatory response and multiple organ dysfunction remain unknown, but several studies have suggested the involvement of genetic factors in development and progression of sepsis [8-11].

Natural Killer (NK) cells are key lymphocytes, involved in early immune response against infected or transformed cells in clinical conditions such as infections, tumors, and allogeneic hematopoietic cell transplantation, while remaining tolerant to self. NK cells are important in sepsis, as they are capable of activating phagocytic cells at the site of infection and produce and release INF- γ , which activates macrophages, so they can eliminate the invader microorganism. NK cells can also be activated by antigen-presentation cells, such as dendritic cells, thus amplifying the inflammatory response [12]. The activity of NK cells is regulated through the balance between signals transduced from activating and inhibitory cell surface receptors that recognize HLA class I

molecules expressed in target cells surface, called killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR). Genes encoding KIR are located on human chromosome 19q13.4 [13-15]. Inhibitory KIR molecules bind to target HLA class I molecules and prevent the attack of NK cells on normal cells. When an activating KIR binds to its ligand, activating signals are generated, leading to the destruction of target cell [14, 16]. To date, seventeen KIR receptors have been characterized in humans: eight inhibitory types (2DL1-3; 2DL5A and B; 3DL1-3), seven activating types (2DS1-5, 3DS1, 2DL4), and two pseudogenes that do not encode a functional KIR receptor (2DP1 and 3DP1). Of these, four are always present and are considered framework genes (2DL4, 3DL2, 3DL3, 3DP1) [17-19]. The ligands for KIR are the classical HLA class I molecules HLA-A, -B and -C. Based on the dimorphism in the epitope at position 80, all HLA-C alleles can be divided into two groups: the C1 group carrying asparagine, and the C2 group carrying lysine at this position. The receptors KIR2DL2, KIR2DL3 and KIR2DS2 bind HLA-C1 ligands, whereas KIR2DL1 and KIR2DS1 bind HLA-C2 ligands. The inhibitory KIR3DL1 recognizes HLA-B Bw4 allotypes and KIR3DL2 binds HLA-A3 and HLA-A11 [20].

Due to KIR specificity for HLA class I allotypes, and their extensive polymorphism, it is pertinent to imply that KIR gene variation affects resistance and susceptibility to a great number of diseases in which the involvement of the immune system is determinant. Genetic susceptibility or resistance to infectious and inflammatory disorders, together with environmental and host risk factors, is thought to determine disease progression [21-22]. There is a diversity of studies describing the relationship between KIR genes and several diseases but, to the best of our knowledge, there is no study examining the role of KIR in sepsis. In

this study, we examined sixteen KIR genes and their HLA class I ligands in a group of 271 critical patients aiming at the identification of patterns in KIR genotypes and HLA ligands that could be associated with sepsis.

2. Methods

2.1. Patient and Control Samples

DNA samples of six hundred and thirty eight critical care patients of both genders, with ages ranging from 14 to 94 years old, admitted to the Intensive Care Unit, São Lucas Hospital, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, in Porto Alegre, Brazil, in the period between 2004 and 2010 were included. Their blood was collected into tubes containing EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) and DNA extracted using a salting-out procedure accordingly to Lahiri and Nurnberger [23]. Samples were properly kept labelled and stored at -80°C until analysis. Only samples with a DNA concentration superior of 20 ng/μL were analyzed.

Subjects were southern Brazil residents, with a majority of subjects with European ethnicity, and a minor number of individuals with African genetic traits [24], and divided into two groups: sepsis - patients who met sepsis criteria - and controls - critical care patients with no sepsis. Social and demographic data, including age, sex, mortality at the ICU and hospital, SOFA e APACHE II scores were obtained from all patients, in addition to the occurrence septic shock and death. Confidentiality was observed for all samples.

Sepsis was defined as a “clinical syndrome defined by the presence of both documented or suspected infection and a systemic inflammatory response (SIRS)”. Signals and symptoms for sepsis were considered as described by Levy and colleagues, 2003 [25]. Severe sepsis was defined as sepsis accompanied by hypoperfusion or organ dysfunction, while septic shock is defined as severe sepsis that demands sustained use of vasopressive drugs. Exclusion criteria included human immunodeficiency virus infection; patients in immunosuppressive therapy; non-Caucasian ancestry; pregnant or lactating women. Patients readmitted to the ICU were excluded.

2.2. KIR Genotyping

KIR was genotyped using the polymerase chain reaction method with sequence-specific oligonucleotide (PCR-SSO, One Lambda® Inc, California, USA) for 16 KIR genes (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 2DP1, 3DP1 and 3DS1). The KIR-SSO Genotyping Test applies Luminex technology (One-Lambda® Inc, Canoga Park, CA, USA) and was performed according to the manufacturer’s instructions. Briefly, genomic DNA, specific primers and manufacturer’s solutions were mixed and the DNA amplified by the GeneAmp PCR system 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT,USA). Resulting products were visualized under UV light after electrophoresis in 1% agarose gel containing ethidium bromide. Internal control was included in each PCR reaction.

2.3. HLA Genotyping

HLA genotyping was performed using the polymerase chain reaction method with sequence-specific primers (PCR-SSP). HLA typing Cw epitope C1 (Cw 01, 03, 07 {01– 06}, 08, 12 {02, 03, 06}, 14, 16 {01, 03, 04}), and C2 (Cw 02, 04, 05, 06, 0707, 12 {04, 05}, 15, 1602, 17, 18) were performed using PCR-SSP, as described by Jones et al., 2006 [19]. HLA-Bw4, A3 and A11 were also performed using PCR-SSP, accordingly to Bunce et al., 1995 [26].

2.4. Ethics

This study was approved by the Research Ethics Board of the Porto Alegre Clinical Hospital (CAEE 10555212.6.0000.5327, protocol number 13-0038) and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All subjects or their surrogates received detailed explanations and provided written consent prior to inclusion in this investigation.

2.5. Statistical Analysis

Comparison of the KIR gene frequency with the control group was executed by Pearson chi-square with continuity correction, and in a few, where the expected difference between the two groups was small, Fisher's exact test was

employed. Significance value was calculated using SPSS for Windows version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The number of genes used was adjusted for with the Bonferroni correction. A p value ≤ 0.05 after correction was considered statistically significant.

3. Results and Discussion

Two hundred and seventy one patients met inclusion criteria and were divided into sepsis (211 patients diagnosed with sepsis) and control (60 critical care patients with no sepsis) groups. Statistical analysis indicated no differences between groups regarded age and gender. Clinical data is shown in Table 1.

KIR gene frequency distribution results among patients with sepsis and controls are shown in Table 2. The frequencies of KIR genes in control group were similar to those found in previous studies of Brazilian populations conducted by our research group [27-31]. As expected, framework genes KIR 2DL4, 3DL2, 3DL3 and 3DP1 were present in all individuals. There was a significantly lower frequency of two activating KIR genes, KIR2DS1 and KIR3DS1 in septic patients in comparison to controls (41.23% *versus* 55.00%, and 36.49% *versus* 51.67%; p values = 0.041 and 0.025, respectively).

HLA gene frequencies for sepsis and controls are shown in Table 3. There were no statistically significant differences in HLA-A, HLA-B or HLA-C between groups, or when analyzing these genes for homozygosis and heterozygosis. In addition, no significant differences were found for C1, C2, Bw4, A3 and A11, although the p value for the association between KIR2DS1 + C2+ fell short of

significance (73.3% for controls *versus* 64,45% for sepsis, $p= 0.057$). Moreover, no differences between groups were found when comparing the inhibitory and activating KIR genes frequencies in the presence of their ligands (Tables 4 and 5). Statistical analysis found no association between the prevalence of KIR genes and clinical outcomes, such as organ dysfunction, hospital and ICU stay and/or mortality, or even patient gravity, measured through SOFA-1 and APACHE II.

Genetic variations in patients with sepsis have been reported over the past few years [8, 9, 11, 32-38], with major focus on the clotting and innate immune systems, aiming a better understanding of possible genetic predispositions for sepsis, sepsis-related organ dysfunction and death. NK cells are a very important part of the innate immune system, playing a key role during early infection events due to its ability to deliver responses that ultimately aim to effectively clear pathogens. They can be rapidly recruited into infected organs and tissues by chemoattractant factors produced by activated resident macrophages and dendritic cells, which are also a major source of interferon $INF\alpha/\beta$ that induces NK cell proliferation and activation. Once activated, NK cells help to limit the dissemination of pathogen infection before the adaptive immune system is initiated, through recognition and elimination of non-self after interaction with their receptors and posterior cytokines release, such as tumor necrosis factor, that will amplify the inflammatory response [15, 39-41].

It has been proposed that alterations in the expression of KIR repertoire on NK cells and their corresponding ligands are associated with some infectious disorders [42], such as dengue [43-44], human immunodeficiency virus [45-48], hepatitis C virus [49-50], and tuberculosis [51-53]. Braun et al described a lower

prevalence of the activating gene KIR2DS3 in patients with tuberculosis when compared to controls, which can be due to the large diversity of their study population, but also can be related to a protective role of the presence of KIR2DS3. Further research is needed [54].

The number and type of KIR genes arranged on the haplotypes vary greatly; a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations reports 573 different KIR genotypes [55]. This wide variation produce substantial differences between individuals in their KIR gene content. Genetic susceptibility or resistance to infectious diseases, in conjunction with environmental and host risk factors, is thought to determine disease progression.

A number of diseases with autoimmune basis, such as lupus, psoriasis vulgaris, psoriatic arthritis, rheumatoid arthritis, diabetes, among others, have been associated with KIR genes, especially with the presence of activating genes, lack of their inhibitors and interaction of KIR/HLA [39, 56-58]. Although we did not observe an association of any genes with its respective ligand, association between KIR2DS1 + C2+ was more prevalent in controls and fell short of significance ($p= 0.057$).

The lower prevalence of activating genes KIR2DS1 and KIR3DS1 in sepsis than in critical patients with no sepsis, suggests that the presence of these activating genes may act as a protective factor against sepsis in critical care patients. This seem to be true for other infectious diseases. A previous study published by Bonagura and colleagues suggested that the presence of activating receptors KIR2DS1 and KIR3DS1 may protect from developing a rare disease of the

larynx and upper airway caused by an HPV strain, HPV-6/11, recurrent respiratory papillomatosis (RRP) [59].

There is no previous report of association between KIR3DS1 and susceptibility to infectious diseases. However, patients with KIR3DS1 infected with HIV show a delay in AIDS progression, suggesting a more effective performance of immune system in those patients [47]. On the other hand, Zhuang and colleagues [49] have shown that activating genes KIR2DS3 and KIR3DS1 were more prevalent in patients with syphilis than in controls without infectious diseases. Other activating KIR genes, such as KIR2DS3, are significantly higher in hepatitis C, chronic hepatitis B and leprosy [60]. Furthermore, Niepieklo-Miniewska et al reported, in 2013, that frequencies of the great majority of KIR genes did not differ between patients and controls, except for KIR2DS1, where frequency was significantly lower in patients than in controls, suggesting a protective effect of KIR2DS3 [61].

The innate immune system is the first line of defense against pathogens, working to recognize common components of pathogens, so that further immune responses can be signaled in the presence of foreign pathogens. Multiple cell types, including macrophages, dendritic cells, neutrophils and epithelial cells, in addition to NK cells, are involved in the development of an immune response, with each cell type having specific functions. NK cells, although primarily involved with lysis of target cells, can as well act by interacting with antigen presenting cells and T-cells. The differences in KIR frequencies may result in differential cytokine expression, contributing to different outcomes, thus there might be a genetic susceptibility to diseases such as sepsis. Perhaps an earlier and more effective identification of the pathogen

can lead to a more effective immune response, protecting the individual against an uncontrolled inflammatory response. Some KIR genes such as KIR3DS1 can bind to HLA-B27 and recruit positive signals, resulting in NK cell activation [60], and this recognition can regulate the immunomodulatory functions of NK cells. Also, it has been reported that the presence of activating gene KIR3DS1, in combination with HLA-B alleles is associated with a delayed progression to acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in individuals infected with human immunodeficiency virus type-1. (HIV-1), suggesting a model involving an epistatic interaction between the two loci [49].

Activating and inhibitory KIR display different ligand affinities, and a model of NK cell response has been considered in which KIR variation and the presence of ligands influence the response level in individual patients, within a range that includes excess of activation, balance, excess of inhibition, or undetermined behavior [62]. This concept is applied to the investigation of susceptibility or protection in a wide spectrum of diseases. The differences in KIR gene frequencies and haplotypes may result in differential cytokine expression, contributing to different host responses to infection and disease outcomes, and suggest a genetic influence on susceptibility and pathogenesis.

It is important to keep in mind that sepsis is a heterogeneous disease and its outcome depends on the causative pathogen, microbial load and virulence, and host characteristics, including the genetic composition for other factors involved in the inflammatory process, age, comorbidities, choice of sepsis treatment, and time until diagnostic [63]. The results provide early information about the role of polymorphisms in KIR during sepsis, suggesting potential prognostic markers that could help predicting sepsis development.

4. Conclusions

In summary, we verified that activating KIR genes 2DS1 and 3DS1 are more prevalent in critical patients without sepsis than in patients with sepsis, suggesting that the presence of activating genes modulate NK-cell response and may play a role as a protective factor for sepsis in critical care patients. Further research focusing on functional studies is warranted.

5. Acknowledgements

This research was performed at the Porto Alegre Clinical Hospital (HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS); and Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS).

6. Funding

Supported by the Immunology Service and the institutional research fund (FIPE), Porto Alegre Clinical Hospital (HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS); the National Institute for Translational Medicine (INCT-TM); and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

The authors have no conflict of interest related to the contents of this manuscript.

7. References

- [1] D.C. Angus, R.S. Wax, Epidemiology of sepsis: An update, *Crit. Care Med.* 29 (2001) S109
- [2] R.P. Dellinger, The Surviving Sepsis Campaign: Where have we been and where are we going?, *Cleve. Clin. J. Med.* 82 (2015) 237
- [4] D.C. Angus, T. van der Poll, Severe sepsis and septic shock, *N. Engl. J. Med.* 369 (2013) 840
- [5] T. Lagu, M.B. Rothberg, M.S. Shieh, P.S. Pekov, J.S. Steingrub, P.K. Lindenauer, Hospitalizations, costs and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007, *Crit. Care Med.* 40 (2012) 754
- [6] B. Khwannimit, R. Bhurayanontachai, The direct costs of intensive care management and risk factors for financial burden of patients with severe sepsis and septic shock, *J. Crit. Care* 30 (2015) 929
- [7] M. Singer, C.S. Deutschman, C.W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, et al, The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3), *JAMA* 315 (2016) 801.
- [8] R.S. Hotchkiss, I.E. Karl, The pathophysiology and treatment of sepsis, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 138.
- [9] J. Arcaroli, M.B. Fessler, E. Abraham, Genetic polymorphisms and sepsis, *Shock* 24 (2005) 300.
- [10] F. Stuber, S. Klaschik, L.E. Lehmann, J.C. Schewe, S. Weber, M. Book, Cytokine promoter polymorphisms in severe sepsis, *Clin. Infect. Dis.* 41 (2005) S416.

- [11] A. Cariou, J.D. Chiche, J. Charpentier, J.F. Dhainaut, J.P. Mira, The era of genomics: impact of sepsis clinical trial design, *Crit. Care Med.* 30 (2002):S341.
- [12] J.L. Casanova, Human genetic basis of interindividual variability in the course of infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 112 (2015) E7118.
- [13] R. de Pablo, J. Monserrat, A. Prieto, M. Alvarez-Mon, Role of circulating lymphocytes in patients with sepsis, *Biomed. Res. Int.* 2014 (2014) 671087.
- [14] K.S. Campbell, J. Hasegawa, Natural killer cell biology: an update and future directions, *J. Allergy Clin. Immunol.* 132 (2013) 536.
- [15] R.J. Boyton, D.M. Altmann, Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease, *Clin. Exp. Immunol.* 149 (2007) 1.
- [16] J.A. Hammerman, K. Ogasawara, L.L. Lanier, NK cells in innate immunity, *Curr. Opin. Immunol.* 17 (2005) 29.
- [17] A.W. MacFarlane 4th, Campbell KS, Signal transduction in natural killer cells, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 298 (2006) 23.
- [18] M.J. Wilson, M. Torkar, J. Trowsdale, Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene, *Tissue Antigens* 49 (1997) 574.
- [19] J. Trowsdale, Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes, *Immunity* 15 (2001) 363.
- [20] D.C. Jones, R.S. Edgar, T. Ahmad, J.R. Cummings, D.P. Jewell, J. Trowsdale, et al, Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combinations in ulcerative colitis susceptibility, *Genes Immun.* 7 (2006) 576.
- [21] S.S. Farag, M.A. Caligiuri, Human natural killer cells development and biology, *Blood Rev.* 20 (2006) 123.

- [22] J.C. Delgado, A. Baena, S. Thim, A.E. Goldfeld, Ethnic-specific genetic associations with pulmonary tuberculosis, *J. Infect. Dis.* 186 (2002) 1463.
- [23] D. Middleton, F. Gonzelez, The extensive polymorphism of KIR genes, *Immunology.* 129 (2010) 8.
- [24] D.K Lahiri, J.I. Nurnberger Jr, A rapid non-enzimatic method for the preparation of HMW from blood for RFLP studies, *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 5444.
- [25] F.C. Parra, R.C. Amado, J.R. Lambertucci, J. Rocha, C.M. Antunes, S.D Pena, Color and genomic ancestry in Brazilians, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100 (2003) 177.
- [26] M.M. Levy, M.P. Fink, J.C. Marshall, 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference, *Crit. Care Med.* 31 (2003) 1250.
- [27] M. Bunce, C.M. O'Neill, M.C. Bernardo, P. Krausa. M.J. Browning, P.J. Morris, et al, Phototyping comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP), *Tissue Antigens* 46 (1995) 355.
- [28] C.C.C. Rudnick, D.S. Franceschi, A.V. Marangon, G.A. Guelsin, A.M. Sell, J.E. Visentainer, Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Southern Brazilian population from the state of Paraná, *Hum. Immunol.* 69 (2008) 872.
- [29] M. Jobim, P. Chagastelles, P.H. Salim, P. Portela, T.J. Wilson, A.G. Curti, et al, Association of killer cell immunoglobulin-like receptors and human leukocyte antigen-C genotypes in South Brazilian with type 1 diabetes, *Hum. Immunol.* 71(2010) 799.

- [30] M. Jobim, P.H. Salim, P. Portela, T.J. Wilson, J. Fraportti, D. Baronio, et al, Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Caucasian population of southern Brazil, *Int. J. Immunogenet.* 37 (2010) 83.
- [31] P. Portela, L.F. Jobim, P.H. Salim, W.J. Koff, T.J. Wilson, M.R. Jobim, et al, Analysis of KIR gene frequencies and HLA class I genotypes in prostate cancer and control group, *Int. J. Immunogenet.* 39 (2012) 423.
- [32] T.J. Wilson, M. Jobim, L.F. Jobim, P. Portela, P.H. Salim, M.A. Rosito, et al, Study of killer immunoglobulin-like receptor genes and human leukocyte antigens class I ligands in a Caucasian Brazilian population with Crohn's disease and ulcerative colitis, *Hum. Immunol.* 71 (2010) 293.
- [33] J. Beppler, P. Koehler-Santos, G. Pasqualim, U. Matte, C.S. Alho, F.S. Dias, et al, Fc Gamma Receptor IIA (CD32A) R131 polymorphysm as a marker of genetic susceptibility to sepsis, *Inflammation* 39 (2016) 518.
- [34] P. Graebin, T.D. Veit, C.S. Alho, F.S. Dias, J.A. Chies, Polymorphic variants in exon 8 at the 3'UTR of the HLA-G gene are associated with septic shock in critically ill patients, *Crit. Care* 16 (2012) R211.
- [35] F.J. de O. Paludo, J.B. Picanço, P.R. Fallavena, L. da R. Fraga, P. Graebin, O. de T. Nóbrega, et al, Higher frequency of septic shock in septic patients with the 47C allele (rs4880) of the SOD2 gene, *Gene* 517 (2013) 106.
- [36] P.R. Fallavena, T. de Jesus Borges, D.D. Paskulin, H.S. Thurow, F.J. de O. Paludo, C. dos S. Froes, et al, The synergy of -260T T CD 14 and -308GG TNF- α genotypes in survival of critically ill patients, *Scand. J. Immunol.* 77 (2013) 62.

- [37] F Majolo, F.J. de O. Paludo, A. Ponzoni, P. Graebin, F.S. Dias, C.S. Alho, Effect of 593C>T GPx1 SNP alone and in synergy with 47C>T SOD2 SNP on the outcome of critically ill patients, *Cytokine* 71 (2015) 312.
- [38] J.A.R. Pedroso, D.D. Paskulin, F.S. Dias, E. de França, C.S. Alho, Temporal trends in acute renal dysfunction among critically ill patients according to I/D and -262A > T ACE polymorphisms, *J. Bras. Nefrol.* 32 (2010) 182.
- [39] A.M. Sutherland, K.R. Walley, Bench-to-bedside review: association of genetic variation with sepsis, *Crit. Care* 13 (2009) 210.
- [40] M.A. Cooper, T.A. Fehniger, A. Fuchs, M. Colonna, M.A. Caligiuri, NK cell and DC interactions, *Trends Immunol.* 25 (2004) 47.
- [41] M. Della Chiesa, S. Sivori, R. Castriconi, E. Marcenaro, A. Moretta, Pathogen-induced private conversations between natural killer and dendritic cells, *Trends Microbiol.* 13 (2005) 128.
- [42] S.E. Kirwan, D.N. Burshtyn, Regulation of natural killer cell activity, *Curr. Opin. Immunol.* 19 (2007) 46.
- [43] A.P. Williams, A.R. Bateman, S.I. Khakoo, Hanging in the balance, KIR and their role in disease. *Mol. Interv.* 5 (2005) 226.
- [44] K. Alagarasu, R.V. Bachal, P.S. Shah, D. Cecilia, Profile of killer cell immunoglobulin-like receptor and its human leucocyte antigen ligands in dengue-infected patients from Western India, *Int. J. Immunogenet.* 42 (2015) 432.
- [45] L.M. Beltrame, A.M. Sell, R.A. Moliterno, S.L. Clementino, D.M. Cardozo, M.M Dalalio, et al, Influence of KIR genes and their HLA ligands in susceptibility to dengue in a population from southern Brazil, *Tissue Antigens* 82 (2013) 397.

- [46] D. Hernández-Ramírez, M.A. Esparza-Pérez, J.L. Ramirez-Garcialuna, J.R. Arguello, P.B. Mandeville, D.E. Noyolla, et al, Association of KIR3DL1/S1 and HLA-Bw4 with CD4 T cell counts in HIV-infected Mexican mestizos, *Immunogenetics* 67(2015) 413.
- [47] Y. Jiang, O. Chen, C. Cui, B. Zhao, X. Han, Z. Zhang, et al, KIR3DS1/L1 and Bw4-80I are associated with HIV disease progression among HIV typical progressors and long-term nonprogressors, *BMC Infect. Dis.* 13 (2013) 405.
- [48] G. Alter, S. Rihn, K. Walter, A. Nolting, M. Martin, E.S. Rosenberg, et al, HLA class I subtype-dependent expansion of KIR3DS1+ and KIR3DL1+ NK cells during acute human immunodeficiency virus type 1 infection, *J. Virol.* 83 (2009) 6798.
- [49] M.P. Martin, X. Gao, J.H. Lee, G.W. Nelson, R. Detels, J.J. Goedert, et al, Epistatic interaction between KIR 3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS, *Nat. Genet.* 31 (2002) 429.
- [50] P. Kusnierczyk, I. Mozer-Lisewska, K. Zwolinska, A.E. Kowala-Piaskowska, M. Bura, I. Bereszynska, et al, Contribution of genes for killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) to the susceptibility to chronic hepatitis C virus infection and to viremia, *Hum. Immunol.* 76 (2015) 102.
- [51] K. Gendzekhadze, P.J. Norman, L. Abi-Rached, T. Graef, A.K. Moesta, Z. Layrisse, et al, Co-evolution of KIR2DL3 with HLA-C in a human population retaining minimal essential diversity of KIR and HLA class I ligands, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106 (2009) 18692.
- [52] C. Lu, Y.J. Shen, Y.F. Deng, C.Y. Wang, G. Fan, Y.Q. Liu, et al, Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with pulmonary tuberculosis in Chinese Han, *Genet. Mol. Res.* 11 (2012) 1370.

- [53] F. Shahsavari, T. Mousavi, A. Azargon, K. Entezami, Association of KIR3DS1+HLA-B Bw4Ile 80 combination with susceptibility to tuberculosis in Lur population of Iran, *Iran J. Immunol.* 9 (2012) 39.
- [54] K. Braun, J. Wolfe, S. Kiazayk, M. Kaushal Sharma, Evaluation of host genetics on outcome of tuberculosis infection due to differences in killer cell immunoglobulin-like receptor gene frequencies and haplotypes, *BMC Genet.* 16 (2015) 63.
- [55] *The Allele Frequency Net Database {KIR Genotype Reference}*. Available at <http://allelefrequencies.net/kir6001a.asp>. Access in September, 2016.
- [56] M. Jobim, L.F. Jobim, P.H. Salim, T.F. Cestari, R. Toresan, B.C. Gil, A study of the killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 in a Caucasoid Brazilian population with psoriasis vulgaris, *Tissue Antigens* 72 (2008) 392.
- [57] M.P. Martin, G. Nelson, J.H. Lee, F. Pellett, X. Gao, J. Wade, et al, Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles, *J. Immunol.* 169 (2002) 2818.
- [58] Y. Hou, C. Zhang, D. Xu, H. Sun, Association of killer cell immunoglobulin-like receptor and human leucocyte antigen-Cw gene combinations with systemic lupus erythematosus, *Clin. Exp. Immunol.* 180 (2015) 250.
- [59] V.R. Bonagura, Z. Du, E. Ashouri, L. Luo, L.J. Hatam, J.A. deVoti, et al, Activating killer cell immunoglobulin-like receptors 3DS1 and 2DS1 protect against developing the severe form of recurrent respiratory papillomatosis, *Hum. Immunol.* 71 (2010) 212.

[60] Y.L. Zhuang, Y. Song, C. Zhu, Y. Zhang, D. Wang, X. Nie, et al, Association of KIR genotypes and haplotypes with syphilis in a Chinese Han population, *Scand. J. Immunol.* 75 (2012) 361.

[61] W. Niepiekło-Miniewska, E. Majorczyk, L. Matusiak, K. Gendzekhadze, I. Nowak, J. et al, Protective effect of the KIR2DS1 gene in atopic dermatitis. *Gene*, 527 (2013): 594.

[62] L.L. Lanier, NK cell receptors, *Annu. Rev. Immunol.* 16 (1998) 359.

[63] W.J. Wiersinga, S.J. Leopold, D.R. Cranendonk, T. van der Poll, et al, Host innate immune responses to sepsis, *Virulence* 5 (2014) 36.

TABLE 1. Demographic and Clinical Data in Sepsis and Control Groups.

Descriptives	Sepsis (n = 211)	Controls (n = 60)	Total (n = 271)
Age, in years (\pm SD)	55.33 (\pm 20.26)?	46.37 19.43)	(\pm 53.34 (\pm 20.4)
Gender (%)	F, 49.30% M, 50.70%	F, 53.33% M, 46.67%	F, 50.20% M, 49.80%
APACHE II mean (\pm sd)	20.64 (\pm 7.45)	14.82 (\pm 7.02)	19.35 (\pm 7.74)
SOFA-1, mean (\pm sd)	7.56 (\pm 3.40)	5.18 (\pm 3.11)	6.17 (\pm 3.53)
No. of organs in dysfunction, mean (\pm sd)	4.07 (\pm 1.36)	3.17 (\pm 1.40)	3.87 (\pm 1.46)
No. of organs in failure, mean (\pm sd)	0.83 (\pm 1.35)	zero	0.65 (\pm 1.21)
Cause of ICU admission			
Respiratory	80 (38.10%)	13 (21.67%)	93 (34.32%)
Cardiovascular	12 (5.70%)	12 (20.00%)	24 (8.86%)
Neurologic	7 (3.30%)	14 (23.33%)	21 (7.75%)
Renal	2 (1.00%)	3 (3.33%)	5 (1.84%)
Gastrointestinal	6 (2.90%)	6 (10.00%)	12 (4.43%)
Sepsis	84 (39.81%)	zero	84 (30.99%)
Abdominal Surgery	20 (9.50%)	6 (10.00%)	26 (9.59%)
Trauma surgery	zero	4 (6.67%)	4 (1.85%)
Unknown	zero	2 (3.33%)	2 (0.74%)
Death during hospital stay	117 (56.00%)	9 (15.25%)	126 (46.49%)
Death during ICU hospitalization	95 (45.00%)	4 (6.67%)	99 (36.53%)

APACHE II, SOFA-1, number of organs in dysfunction and number of organs in failure during ICU hospitalization are shown as mean (\pm) standard deviation SD. Causes of ICU hospitalization, deaths during ICU hospitalization and hospital stay are shown as total number (%).

TABLE 2. Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor (KIR) Gene Frequencies in Control (n = 60) and Sepsis Groups (n = 211).

KIR gene	Control	Sepsis	<i>p</i> value ^a
	N (%)	N (%)	
KIR2DL1	57 (95.00)	199 (94.31)	NS
KIR2DL2	33 (55.00)	119 (56.40)	NS
KIR2DL3	52 (86.67)	187 (88.63)	NS
KIR2DL4	60 (100.00)	211 (100.00)	NS
KIR2DL5	41 (68.33)	118 (55.92)	NS
KIR2DP1	57 (95.00)	199 (94.31)	NS
KIR2DS1	33 (55.00)	87 (41.23)	0.041
KIR2DS2	32 (53.33)	115 (54.50)	NS
KIR2DS3	22 (36.67)	64 (30.33)	NS
KIR2DS4	56 (93.33)	195 (92.42)	NS
KIR2DS5	24 (40.00)	75 (35.55)	NS
KIR3DL1	57 (95.00)	196 (92.89)	NS
KIR3DL2	60 (100.00)	211 (100.00)	NS
KIR3DL3	60 (100.00)	211 (100.00)	NS
KIR3DP1	60 (100.00)	211 (100.00)	NS
KIR3DS1	31 (51.67)	77 (36.49)	0.025

Activating genes KIR2DS1 and KIR3DS1 are less frequent in patients with sepsis. ^a Chi-Square test or Fisher's exact test with Bonferroni correction.

TABLE 3. Frequencies of KIR Ligands in Controls and Septic Patients

	Control	Sepsis	
Gene	N (%)	N (%)	p value^a
A3	9 (15.00)	40 (18.95)	NS
A11	4 (6.67)	5 (2.37)	NS
Bw4	40 (66.67)	131 (62.08)	NS
C1	49 (81.67)	175 (82.94)	NS
C2	47 (78.33)	149 (70.66)	NS
C1/C1	13 (21.67)	62 (29.38)	NS
C2/C2	11 (18.33)	36 (17.06)	NS
C1/C2	36 (60.00)	113 (53.55)	NS

^a Chi-Square test or Fisher's exact test with Bonferroni correction.

C1 group: HLA-Cw 01, 03, 07 (01-06), 08, 12 (02, 03, 06), 14, 16 (01, 03, 04)

C2 group: HLA-Cw 02, 04, 05, 06, 07, 12 (04, 05), 15, 16, 17, 18.

Bw4: HLA-B 08, 13, 27, 44, 51, 52, 53, 57, 58.

TABLE 4. Inhibitory KIR Gene Frequencies in the Presence or Absence of their Ligands in Controls and Septic Patients

Genes	Controls	Sepsis	p value^a
	N (%)	N (%)	
KIR2DL1+ C2+	44 (73.33)	136 (64.45)	NS
KIR2DL1+ C2/C2	10 (16.67)	36 (17.06)	NS
KIR2DL2+ C1+	25 (41.67)	102 (48.34)	NS
KIR2DL2+ C1/C1	8 (13.33)	33 (16.64)	NS
KIR2DL3+ C1+	43 (71.67)	159 (75.36)	NS
KIR2DL3+ C1/C1	13 (21.67)	58 (24.49)	NS
KIR3DL1+ Bw4+	37 (61.67)	120 (56.87)	NS
KIR3DL2+ A3+	9 (15.00)	40 (18.96)	NS
KIR3DL2+ A11+	4 (6.67)	5 (2.37)	NS

^a Chi-Square test or Fisher's exact test with Bonferroni correction.

C1 group: HLA-Cw 01, 03, 07 (01-06), 08, 12 (02, 03, 06), 14, 16 (01, 03, 04)

C2 group: HLA-Cw 02, 04, 05, 06, 07, 12 (04, 05), 15, 16, 17, 18.

Bw4: HLA-B 08, 13, 27, 44, 51, 52, 53, 57, 58.

TABLE 5. Activating KIR Gene Frequencies in the Presence or Absence of their Ligands in Controls and Septic Patients

Genes	Controls	Sepsis	p value ^a
	N (%)	N (%)	
KIR2DS2+ C1+	24 (40.00)	98 (46.45)	NS
KIR2DS2+ C1/C1	8 (13.33)	33 (15.64)	NS
KIR2DS1+ C2+	24 (40.00)	57 (27.01)	NS
KIR2DS1+ C2/C2	6 (10.00)	14 (6.63)	NS
KIR3DS1+ Bw4+	21 (35.00)	51 (24.17)	NS

^a Chi-Square test or Fisher's exact test with Bonferroni correction.

C1 group: HLA-Cw 01, 03, 07 (01-06), 08, 12 (02, 03, 06), 14, 16 (01, 03, 04)

C2 group: HLA-Cw 02, 04, 05, 06, 07, 12 (04, 05), 15, 16, 17, 18.

Bw4: HLA-B 08, 13, 27, 44, 51, 52, 53, 57, 58.

6. DADOS NÃO PUBLICADOS

Foram encontradas 43 combinações possíveis de genes KIR neste grupo de 271 pacientes. Ao classificarmos os pacientes de acordo com os haplótipos, encontramos a distribuição apresentada na Figura 12.

É possível perceber que o haplótipo B foi mais prevalente nesta população, embora a literatura descreva que haplótipos A e B estejam distribuídos de modo semelhante nas populações caucasoides, sem prevalência de A ou B (118-121). Também é possível verificar que o haplótipo A foi mais prevalente entre os controles que pacientes sépticos. Poderíamos considerar a hipótese de que a resposta inflamatória sistêmica e exacerbada na sepse estaria influenciada pela prevalência de haplótipos B, que se caracteriza por mais genes ativadores.

Entretanto, possuir o haplótipo A está associado com risco de mortalidade hospitalar de 52,5%, conforme Figura 13. Considerando que o haplótipo A é caracterizado pela presença de somente um gene ativador, KIR2DS4, e que o haplótipo B é caracterizado pela presença de maior número, variedade e combinações de genes ativadores, este resultado poderia sugerir possível resposta imune mais eficaz e maior proteção contra sepse em pacientes críticos com haplótipo B. Estudos futuros testando estas hipóteses são necessários.

Não foram encontradas associações entre haplótipos e disfunção orgânica, SOFA-1, SOFA médio ou APACHE II.

ID	Hap	KIR Genes															No. de genes				Pacientes N = 211		Controles N = 60		Total N = 271		
		Inhibitory KIR						Activating KIR					Pseudogenes		T	I	E	P	n	%	n	%	n	%			
		2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	3DL1	3DL2	3DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5											3DS1	2DP1	3DP1
1	AA																	9	6	1	2	62	29,38	15	25,00	77	28,41
2	Bx																	10	6	2	2	1	0,47	0	0	1	0,37
3	Bx																	10	7	1	2	1	0,47	0	0	1	0,37
4	Bx																	10	6	2	2	1	0,47	0	0	1	0,37
5	Bx																	8	5	2	1	4	1,89	2	3,33	6	2,21
6	Bx																	9	6	2	1	3	1,42	0	0	3	1,11
7	Bx																	9	6	2	1	1	0,47	0	0	1	0,37
8	Bx																	10	6	2	2	1	0,47	0	0	1	0,37
9	Bx																	11	7	2	2	19	9,00	2	3,33	21	7,77
10	Bx																	11	8	1	2	1	0,47	0	0	1	0,37
11	Bx																	11	7	2	2	1	0,47	0	0	1	0,37
12	Bx																	11	7	2	2	6	2,84	1	1,67	7	2,58
13	Bx																	12	8	2	2	0	0	3	5,00	3	1,11
14	Bx																	13	8	3	2	21	9,96	2	3,33	23	8,48
15	Bx																	10	6	2	2	1	0,47	0	0	2	0,74
16	Bx																	12	8	2	2	1	0,47	1	1,67	2	0,74
17	Bx																	12	7	3	2	1	0,47	0	0	1	0,37
18	Bx																	11	6	4	1	1	0,47	0	0	1	0,37
19	Bx																	13	8	3	2	0	0	1	1,67	1	0,37
20	Bx																	14	8	4	2	6	2,84	0	0	6	2,21
21	Bx																	13	8	3	2	2	0,95	1	1,67	3	1,11
22	Bx																	11	6	3	2	1	0,47	0	0	1	0,37
23	Bx																	11	6	3	2	2	0,95	0	0	2	0,74
24	Bx																	13	7	4	2	4	1,89	1	1,67	5	1,84
25	Bx																	12	6	4	2	1	0,47	0	0	1	0,36
26	Bx																	13	6	5	2	2	0,95	0	0	2	0,74
27	Bx																	14	7	5	2	4	1,89	2	3,33	6	2,21
28	Bx																	13	7	4	2	1	0,47	3	5,00	4	1,47
29	Bx																	13	7	4	2	0	0	1	1,67	1	0,37
30	Bx																	14	8	4	2	1	0,47	0	0	1	0,37
31	Bx																	14	7	5	2	3	1,42	0	0	3	1,11
32	Bx																	15	8	5	2	9	4,27	6	10,00	15	5,53
33	Bx																	11	6	3	2	1	0,47	1	1,67	1	0,37
35	Bx																	13	7	4	2	20	9,48	8	13,32	28	10,33
36	Bx																	12	6	5	1	3	1,42	1	1,67	4	1,47
38	Bx																	14	7	5	2	1	0,47	0	0	1	0,37
39	Bx																	15	8	5	2	13	6,16	5	8,33	18	6,64
40	Bx																	14	7	5	2	2	0,95	1	1,67	3	1,11
41	Bx																	15	8	5	2	2	0,95	0	0	2	0,74
42	Bx																	15	7	6	2	1	0,47	1	1,67	2	0,74
43	Bx																	16	8	6	2	6	2,84	2	3,33	8	2,95

Figura 12: Genes KIR e sua frequência em pacientes sépticos (n = 211) e controles (n = 60) em uma população de pacientes críticos do Sul do Brasil. Retângulos em cinza representam a presença do gene. Hap = haplótipo. N = número total de pacientes; n = número de indivíduos com o genótipo. I = gene KIR inibitório; E = gene KIR excitatório; P = pseudogene.

Haplogrupo	Pacientes N = 211 n (%)	Controles N = 60 n (%)	Total N = 271 n (%)
AA	62 (29,38)	15 (25,00)	77 (28,41)
Bx	149 (70,62)	45 (75,00)	194 (71,59)
Total	211 (100,00)	60 (100,00)	271 (100,00)

Tabela 6: Comparação da frequência de genótipos KIR entre pacientes sépticos e controles em uma população de pacientes críticos do Sul do Brasil.

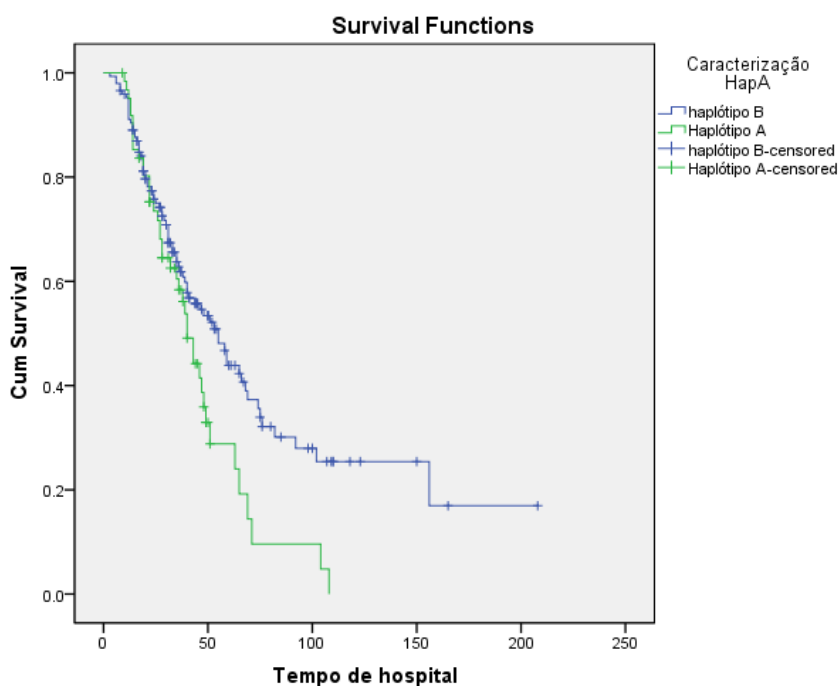


Figura 13: Comparação da sobrevivência hospitalar (em dias) entre pacientes sépticos (n = 211) e controles (n = 60) em uma população de pacientes críticos do Sul do Brasil. O haplótipo A está associado a risco de mortalidade de 52,5% (P = 0,034, após ajuste para idade).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo foi o primeiro a demonstrar a prevalência de genes KIR na sepse, onde os genes ativadores KIR2DS1 e KIR3DS1 foram mais frequentes nos controles que em pacientes com sepse (41,23% *versus* 55,00%, e 36,49% *versus* 51,67%; $p = 0,041$ e $0,025$, respectivamente).

Limitações incluem o não-pareamento de casos e controles e a perda de grande parte das amostras. Uma vez que as amostras de DNA e dados dos pacientes fazem parte de um projeto “guarda-chuva”, parte das amostras já foi extinta, e parte não apresentava a concentração necessária de DNA para a análise. Isto fez com que houvesse uma diferença muito grande entre casos e controles, o que pode ter tido influência sobre a estatística, embora não houvesse diferença entre os grupos quando comparado por gênero e idade. Considerando que o diagnóstico de sepse é tema de debate e bastante subjetivo, não se pode excluir a possibilidade de existirem falso-positivos e falso-negativos.

A avaliação de pacientes com infecção documentada e microorganismo causador identificado, verificando se existem diferenças nos desfechos em pacientes com sepse de acordo com o agente infeccioso e/ou sítio de infecção, poderia trazer resultados mais objetivos do ponto de vista prognóstico. Considerando a importância da comunicação entre NK e DC na sepse, seria interessante verificar se a ausência de genes ativadores pode determinar a ativação

subsequente de DC em estudos *in vivo*. Avaliar o papel de haplótipos na sepse e seus desfechos também deve ser considerado.

Estes resultados fornecem informação inicial sobre o papel de polimorfismos de KIR na sepse, sugerindo que este possa ser um potencial marcador diagnóstico ou prognóstico da doença, ou mesmo um fator de proteção. Novas pesquisas são necessárias para confirmar esta hipótese. Frente ao escasso conhecimento disponível sobre a fisiopatologia da sepse, esse estudo fornece novos *insights* para pesquisas futuras.

8. ANEXOS

8.1. STROBE CHECKLIST

	Item No	Recommendation
Title and abstract	1	“ANÁLISE DE KIR EM PACIENTES COM SEPSE” A sepse é uma síndrome heterogênea, definida como disfunção orgânica que ameaça à vida, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção. A sepse é um problema de saúde mundial, graças à sua alta prevalência, morbimortalidade associada e custos para seu tratamento. As células <i>Natural Killer</i> (NK) fazem parte do sistema imune inato reconhecendo moléculas de HLA de classe I em células alvo, através de seus receptores de membrana <i>killer cell immunoglobulin-like receptors</i> (KIR). A intensidade da resposta à infecção pode variar entre indivíduos, logo é possível considerar e que esta seja determinada por bases genéticas, e estas determinem a ocorrência de sepse e variabilidade nos desfechos.
Introduction		
Background/rationale	2	Fatores genéticos que predisponham o paciente à infecção e o curso desta tem sido considerados como determinantes de gravidade e mortalidade. Embora o sentido geral da ativação do sistema imune, da inflamação e da cascata de coagulação sejam comuns a todos os indivíduos, existem diferenças interindividuais importantes na resposta à infecção, que podem representar implicações clínicas importantes. Isto parece ser verdadeiro também para a sepse, visto que um grande número de estudos buscou associar a presença de polimorfismos genéticos com a suscetibilidade à sepse e ao choque séptico, à severidade e mortalidade na doença.
Objectives	3	Avaliar a associação entre os genes KIR e os ligantes HLA em pacientes críticos, comparando pacientes com sepse e controles não sépticos internados na mesma UTI.
Methods		
Study design	4	Trata-se de um estudo de casos e controles.
Setting	5	Pacientes críticos oriundos da Unidade de Terapia Intensiva do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, no período de 2004 a 2010. O sangue foi coletado após assinatura do Termo de Compromisso Livre e Esclarecido, o DNA extraído através da técnica de

salting-out e mantido a -80°C até o momento das análises.

Participants	6	Foram incluídos como casos os pacientes admitidos na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, no período de 2004 a 2010 e que apresentaram critérios para diagnóstico de sepse de acordo com Levy, 2003; foram incluídos controles oriundos da mesma unidade, no mesmo período, que não apresentaram sepse durante a internação. Tanto casos quanto controles autodenominaram-se caucasóides.
Variables	7	Foi realizada genotipagem dos genes <i>KIR</i> PCR-SSO e os ligantes HLA por PCR-SSP. Procura-se avaliar associações que possam sugerir suscetibilidade/proteção para sepse, sepse grave choque séptico, disfunções orgânicas, gravidade e mortalidade na UTI e no hospital..
Data sources/ measurement	8*	O DNA foi obtido de amostras de sangue periférico de pacientes e controles e extraído pelo método de <i>salting-out</i> (Miller, 1988). Os genes <i>KIR</i> foram tipados pelo método de PCR-SSO (RSSOKIR-One Lambda) que identifica a presença ou ausência de 16 genes. A tipagem HLA classe I foi realizada pelo método de PCR-SSP baseado em <i>primers</i> (sequência específica), como foi descrito em estudos anteriores (Bunce, 1995 e Jones, 2006).
Bias	9	A definição de Caucasoíde foi autodenominada, o que pode ser uma causa de viés.
Study size	10	Foram incluídos consecutivamente todos os pacientes que atenderam aos critérios de inclusão, aceitaram participar da pesquisa e cuja concentração da amostra de DNA fosse superior a 20ng/mL.
Quantitative variables	11	A frequência dos genes foi ajustada usando a correção de Bonferroni, para múltiplos testes.
Statistical methods	12	Dados foram analisados usando o programa SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A idade dos grupos foi calculada pelo teste <i>t</i> , enquanto o gênero pelo teste do qui-quadrado. As associações entre <i>KIR</i> e seus ligantes foram avaliadas utilizando <i>odds ratio</i> (OR) estimada por regressão logística. Os valores de <i>p</i> foram considerados estatisticamente significativas quando <0,05. O número de genes foi ajustado por correção de Bonferroni. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA sob número 130038
Results		
Participants	13*	Foram incluídos 271 pacientes, sendo 211 casos e 60 controles.
Descriptive data	14*	Distribuição por gênero e idade

Outcome data	15	Estudo caso-controle: foi observada diferença na frequência dos genes KIR e ativadores entre pacientes sépticos e controles. Não houve diferença entre os ligantes HLA entre os pacientes sépticos e controles.
Main results	16	Os genes ativadores KIR2DS1 e KIR3DS1 foram mais frequentes nos controles que nos pacientes com sepse (41.23% <i>versus</i> 55.00%, e 36.49% <i>versus</i> 51.67%; $p = 0.041$ e 0.025 , respectivamente).
Other analyses	17	Realizamos análises comparando a frequência dos genes KIR com complicações relacionadas à sepse, tempo de internação e mortalidade, porém não obtivemos resultados significativos.
Discussion		
Key results	18	Estes resultados fornecem informação inicial sobre o papel de polimorfismos de KIR na sepse, sugerindo que a ausência de genes ativadores na sepse possa constituir um potencial marcador diagnóstico ou prognóstico da doença.
Limitations	19	Teria sido de interesse analisarmos as células NK no sítio da infecção, tanto do ponto de vista da genotipagem como da atividade “in vitro”, e avaliar sua interação com células dendríticas.
Interpretation	20	Os resultados do nosso estudo indicam que os genes ativadores KIR2DS1 e KIR3DS1 foram mais frequentes nos controles que nos pacientes com sepse (41.23% <i>versus</i> 55.00%, e 36.49% <i>versus</i> 51.67%; $p = 0.041$ e 0.025 , respectivamente). Não existem dados na literatura sobre polimorfismos de KIR na sepse que possam servir como comparação para estes resultados. Pode-se considerar a hipótese que a presença de genes ativadores tenham potencial para proteger o indivíduo de sepse.
Generalisability	21	Estes dados iniciais sugerem que a existência de associação na proteção pelas células NK na sepse parece provável. Mais pesquisas são necessárias para confirmar esta hipótese.
Other information		
Funding	22	Este trabalho teve apoio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (ICT-TM) e do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq).

8.2. PROTOCOLO DE PESQUISA

Projeto: ANÁLISE DE KIR EM PACIENTES COM SEPSE

Código do

paciente: _____

CONTROLES

CASOS

Tipagem HLA

HLA-C1: Positivo Negativo

HLA-C2: Positivo Negativo

HLA-Bw4: Positivo Negativo

HLA-A3: Positivo Negativo

HLA-A11: Positivo Negativo

Tipagem KIR:

8.3. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Página 1 de 3.

Título da pesquisa:

Efeitos da Herança de Variantes Gênicas Polimórficas em Pacientes com Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA)

Justificativa e objetivos da pesquisa:

Esta pesquisa tem por objetivo estudar as características genéticas de pessoas internadas em unidades de terapia intensiva (UTIs) para identificar quais são as suas predisposições a desenvolver complicações durante a internação. Algumas pessoas internadas em UTIs podem apresentar uma complicação respiratória grave chamada Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (abreviada por SARA) que pode causar alterações importantes no funcionamento dos outros órgãos do corpo humano.

Cada pessoa tem particularidades próprias em relação as suas características genéticas. Assim, algumas pessoas internadas em uma UTI podem ter maior ou menor predisposição à desenvolver uma complicação como a SARA.

O objetivo principal desta pesquisa é estudar pessoas internadas em UTIs que desenvolveram SARA para entender se há alguma associação entre suas características genéticas e a ocorrência da SARA, e se há associação com as outras complicações decorrentes da SARA.

Para isso, nós analisaremos o material genético (DNA) dos pacientes que estiverem internados na Unidade de Tratamento Intensivo Geral do Hospital São Lucas - UTIG / HSL / PUCRS. O material genético (DNA) será obtido através de uma amostra do sangue que é coletado durante os procedimentos de rotina do paciente internado na UTIG / HSL / PUCRS.

Serão estudados seis segmentos do DNA de cada paciente, isto é, serão estudados seis genes, através dos quais será possível se ter um perfil genético de cada pessoa. Os nomes dos genes que serão estudados são os seguintes: 1- gene CD14; 2 - gene eNOS; 3 - gene ECA; 4 - gene SOD2; 5 - gene TNFB e gene: IL-1Ra.

Após a análise genética, serão comparados os resultados provenientes do estudo do DNA com os dados que refletem o estado geral de saúde do paciente.

Com este estudo esperamos compreender melhor: (I) o quanto as características genéticas influenciam no sucesso da recuperação de um paciente de UTI; (II) o quanto as características genéticas influenciam no sucesso da recuperação de um paciente com SARA; e (III) o quanto as características genéticas influenciam na suscetibilidade das pessoas às diferentes fragilidades biológicas.

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 trabalho, vamos usar parte de uma amostra do sangue que é coletado durante os procedimentos de rotina do paciente internado na UTIG / HSL / PUCRS. 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 utilizados amostras de material biológico e dados coletados na rotina da UTIG / HSL / PUCRS.

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

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 herança genética tem sobre as pessoas. No entanto, haverá benefícios para a ciência, pois os dados do paciente estarão contribuindo na descoberta de indicadores genéticos 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 UTIG / HSL / PUCRS 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 de DNA e outros dados em estudos futuros:

A partir da mesma amostra do material genético, poderão ser futuramente estudados outros segmentos de DNA. Para isso, o paciente (ou responsável) poderá permitir que sua amostra de DNA 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

Página 3 de 3.

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 do Dr. Fernando S. Dias 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 genético 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 no material genético analisado 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 genético seja usado em novos estudos.

Caso tenha novas perguntas sobre este estudo, posso telefonar ao Dr. Fernando S. Dias nos telefones (51) 99743803 ou (51) 3320 3000 ramal 3037. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo, ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar também à Dra. Clarice S. Alho nos telefones (51) 9113 6334 ou (51) 3320 3568 e os responsáveis pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-PUCRS no telefone (51) 3320 3000 ramal 3345. As ligações para os celulares poderão ser realizadas a cobrar.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

		___ / ___ / 20___
Assinatura do Paciente (ou responsável)	Nome do Paciente (ou responsável)	Data

		___ / ___ / 20___
Assinatura do Pesquisador	Nome do Paciente	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*) pelo pesquisador _____ (*preencher com nome do pesquisador*) enquanto eu estava presente como testemunha.

		___ / ___ / 20___
Assinatura da Testemunha	Nome da Testemunha	Data

8.4. CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 130038

Data da Versão do Projeto:

Pesquisadores:

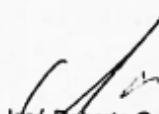
GILBERTO SCHWARTSMANN
LUIZ FERNANDO JOB JOBIM
CLARICE SAMPAIO ALHO
LUCIANA MELLO DE OLIVEIRA
RAFAEL ROESLER
PIETRA GRAEBIN
PÂMELA PORTELA
FERNANDO SUPARREGUI DIAS

Título: Análise de receptores KIR em pacientes com sepse.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 22 de maio de 2013.


Prof. José Roberto Goldim
Coordenação CEP/HCPA

8.5. TERMO DE CONHECIMENTO DE PESQUISA

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLÍNICA

Venho por esta declarar que conheço e autorizo a investigação no Laboratório de Patologia Clínica do projeto intitulado “Análise de receptores KIR em pacientes com sepse” de autoria de Gilberto Schwartzmann, Rafael Roesler, Mariana Jobim, Luciana Mello de Oliveira, Pâmela Portela, Pietra Graebin, Clarice Sampaio Alho, Fernando Suparregui Dias, além de mim, Luiz Fernando Jobim.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos.

Atenciosamente,



Luiz Fernando Jobim

Chefe do Serviço de Patologia Clínica

Porto Alegre, 22 de janeiro de 2013.

8.6. TERMO DE CONFIDENCIALIDADE DOS DADOS



Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas

Título do Projeto

Análise de receptores KIR em pacientes com sepse.

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos materiais biológicos estão mantidos em biorepositórios, bem como de suas respectivas informações associadas, contidas em prontuários e bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Porto Alegre, 26 de novembro de 2012.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
Gilberto Schwartzmann	
Rafael Roesler	
Mariana Jobim	
Luiz Fernando Jobim	
Luciana Mello de Oliveira	
Pâmela Portela	
Pietra Graebin	
Clarice Sampaio Alho	
Fernando Suparrêgui Dias	

8.7. COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO ORIGINAL

Fwd: Thank you for your submission to Human Immunology Angus Sammons

Rafael Reisler rafalreisler
para mim, gponessa, pmarconi, fupamaguides, jacquedupier, piemagrassi, csalho, giberto-ec, pic, Luiz, Mariana

1 de out (14 dias) Responder

inglês Tradutor mensagens Desativar para inglês

Caros colegas,

Submissão do primeiro paper do doutorado de Lu para a Human Immunology.

Abrços e bom final de semana a todos

Rafael

----- Forwarded message -----
From: Human Immunology rs300@ash-hi.org
Date: 2016-10-01 12:20 GMT-03:00
Subject: Thank you for your submission to Human Immunology
To: rafalreisler@hock.edu.br, rafal.reisler@hock.edu.br

Dear Prof. Reisler,

Thank you for sending your manuscript *Reduced frequency of two activating KIR genes in patients with sepsis* for consideration to Human Immunology. Please accept this message as confirmation of your submission.

When should I expect to receive the Editor's decision?

For Human Immunology, the average editorial time (in weeks) from submission to first decision is: 12.47
and from submission to final decision is: 25.24

What happens next?

Here are the steps that you can expect as your manuscript progresses through the editorial process in the Elsevier Editorial System (EES):

1. First, your manuscript will be assigned to an Editor and you will be sent a unique reference number that you can use to track it throughout the process. During this stage, the status in EES will be "With Editor".
2. If your manuscript matches the scope and satisfies the criteria of Human Immunology, the Editor will identify and contact reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer-review is a voluntary service, it can take some time but please be assured that the Editor will regularly remind reviewers if they do not reply in a timely manner. During this stage, the status will appear as "Under Review".
3. Once the Editor has received the minimum number of expert reviews, the status will change to "Required Reviews Complete".

It is also possible that the Editor may decide that your manuscript does not meet the journal criteria or scope and that it should not be considered further. In this case, the Editor will immediately notify you that the manuscript has been rejected and may recommend a more suitable journal.

For a more detailed description of the editorial process, please see *Paper Lifecycle from Submission to Publication*: http://help.elsevier.com/authorcenter/details_010003045.

How can I track the progress of my submission?
You can track the status of your submission at any time at <http://ees.elsevier.com/hi/>

Once there, simply:

1. Enter your username. Your username is: rafalreisler@hock.edu.br


If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/hi/authorcenter/author_center.asp

2. Click on [Author Login]. This will take you to the Author Main Menu.
3. Click on [Submissions Being Processed]

Many thanks again for your interest in Human Immunology.

Kind regards,
Dr Steven Mack

If you require further assistance, you are welcome to contact our Researcher Support team 24/7 by live chat and email or 24/5 by phone: <http://support.elsevier.com>

 [H01-9-16-08866.pdf](#)
2016-10-01