



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA- UFBA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



LARA SOUSA CRUZ DE OLIVEIRA

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM PACIENTES  
COM SEPSE E A CORRELAÇÃO COM O PERFIL INFLAMATÓRIO: ANÁLISE IN  
SILICO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES

Salvador/BA  
2023

LARA SOUSA CRUZ DE OLIVEIRA

**Identificação de Genes Diferencialmente Expressos em  
Pacientes com Sepsis e a Correlação com o Perfil  
Inflamatório: Análise in Silico de Potenciais Biomarcadores**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup> Simone Garcia Macambira

**Coorientadora:** Dr<sup>a</sup> Jaqueline França

Salvador/BA  
2023

O48 Oliveira, Lara Sousa Cruz de

Identificação de genes diferencialmente expressos em pacientes com sepse e a correlação com o perfil inflamatório: análise in sílico de potenciais biomarcadores/Lara Sousa Cruz de Oliveira. – Salvador, 2023.

58 f.: il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Garcia Macambira; Coorientadora:  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Jaqueline França.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2023.

Inclui referências.

1. Sepse. 2. Biomarcadores. 3. Expressão gênica. I. Macambira, Simone Garcia. II. França, Jaqueline. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 616.94:575

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho, aos meus pais Lucelena e Ricardo meus maiores e melhores orientadores na vida e por serem responsáveis por tudo que sou hoje.

Ao meu noivo, Caio, pelo apoio incondicional em todos os momentos difíceis da minha trajetória acadêmica, pelo amor, carinho, compreensão dedicados a mim e por fazer parte da minha vida.

Aos meus irmãos Manu e Diogo, aos meus tios e primos pelo carinho, dedicação e pelos exemplos de vida e honestidade e aos meus amigos por entenderem a minha ausência durante esse período e nunca me abandonarem.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, sem ele nada seria possível. A minha orientadora Dra. Simone Macambira pela paciência, dedicação, carinho e amizade, por ter me ensinado grande parte do que sei, pelo incentivo e por ter sempre acreditado em mim e no meu trabalho. Ao Me. Vitor Neves, por me ajudar e ensinar com toda a paciência e dedicação praticamente tudo sobre bioinformática. A Letícia minha amiga de longa data e companheira de projeto, pelo apoio, incentivo e ajuda. Agradeço a UFBA e ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia pela oportunidade e pelo conhecimento prestado. Aos professores e colegas de bases pelo conhecimento e aprendizado compartilhado. Agradeço a agência de fomento CNPq, pelo suporte financeiro. Agradeço a minha família que mesmo distante sempre me deu apoio, incentivo e acreditou no meu trabalho. Ao meu Noivo Caio e sua família, principalmente seus pais Elaine e Leandro pelo apoio, carinho e dedicação.

## RESUMO

**Introdução:** A sepse é um problema de saúde pública mundial e representa a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo em unidades de terapia intensiva não destinadas a pacientes cardiopatas. A incidência e a mortalidade da sepse ainda são elevadas, e tem um grande impacto econômico e social. Apesar de toda a dedicação para uma investigação mais minuciosa a fim de um diagnóstico e prognóstico precoce e preciso nas últimas décadas, esta abordagem continua sendo um desafio considerável e crescente aos cuidados de saúde. Neste contexto de desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico rápidas, acessíveis e adequadas para melhorar a identificação, prevenção e tratamento da sepse, destaca-se o uso dos genes diferencialmente expressos (GDE) como potenciais biomarcadores no diagnóstico e prognóstico da sepse. Portanto, o objetivo dessa pesquisa foi estudar o perfil de expressão dos genes e sua correlação com as vias intracelulares moduladas por citocinas e fatores de crescimento associadas à progressão e severidade da sepse. **Métodos & Resultados:** Após o levantamento nos bancos de dados publicamente disponíveis em NCBI GEO dataset, posteriormente, foram selecionados três conjuntos de dados de expressão por *array*, que atenderam aos critérios de inclusão deste estudo o GSE12624 (controle com n=36 e complicado por sepse com n=34), GSE131761 (um grupo controle com n=15 amostras, um grupo choque séptico com n=81 amostras.) e GSE69063 (pacientes com sepse n=19 amostras e controle n=11 amostras). Foram escolhidos os GDE que possuíam um *p*-valor <0,05 e cuja expressão apresentava Fold Change menor que -1,1 ou maior que +1,1. Os genes foram analisados segundo o programa de enriquecimento de vias *Enrichr* para verificar se a expressão gênica dos indivíduos é consistente com a doença estudada. Logo em seguida foi construída uma rede de interações entre os genes através do programa *String*. A análise de ontologia dos genes das principais vias intracelulares apresentou expressão significativamente aumentada. Através do diagrama de *Venn* foram identificados cinco genes diferencialmente expressos presentes nos três estudos o ARG1, RPSKA5, HAPGD, DAAM2 E PCOLCE2 esses cinco genes foram analisados no *String*. Foi construída uma rede de interações entre os genes através deste programa. Foram feitas as análises dos genes avaliados quanto à sensibilidade e especificidade com base na intensidade de sinal de cada amostra através da ferramenta estatística SPSS 20.0. **Conclusão:** Os genes ARG1, HAPGD, DAAM2 E PCOLCE2 estão envolvidos em diversas vias intracelulares relacionadas à sepse e apresentaram uma boa especificidade e sensibilidade. Estes resultados colaboram para o entendimento do papel desses genes na sepse e irá ajudar na construção de um perfil de assinatura para o diagnóstico precoce e prognóstico preciso da doença.

**Palavras-chave:** Sepse; Biomarcadores; Expressão gênica.

## ABSTRACT

**Introduction:** Sepsis is a global public health problem and represents the leading cause of morbidity and mortality worldwide in non-cardiac intensive care units. The incidence and mortality of the sepsis are still high, and has a great economic and social impact. Despite all the dedication to a more thorough investigation in order to diagnose and precocious and accurate prognosis in recent decades, this approach remains a considerable and growing challenge to health care. In this context of the development of quick, accessible and suitable diagnostic tools to improve sepsis identification, prevention and treatment, the use of differentially expressed genes (GDE) as potential biomarkers in the diagnosis and prognosis of sepsis. Therefore, the objective of this research was to study the expression profile of genes and their correlation with intracellular pathways modulated by cytokines and growth factors associated with sepsis progression and severity. **Methods & Results:** After survey of publicly available databases in NCBI Geo DataSet, three array expression data sets were later selected, which met the inclusion criteria of this study the GSE12624 (control with n = 36 and complicated by sepsis with n = 34), GSE131761 (a control group with n = 15 samples, a septic shock group with n = 81 samples.) and GSE69063 (patients with sepsis n = 19 samples and control n = 11 samples). The GDE were chosen that had a p -value <0.05 and whose expression had a fold change less than -1.1 or larger than +1.1. The genes were analyzed according to the Enrichr road enrichment program to verify that the gene expression of individuals is consistent with the studied disease. Soon after a network of interactions was built between the genes through the String program. Ontology analysis of the main intracellular pathways had significantly increased expression. Through the VENN diagram, five differentially expressed genes present in the three studies ARG1, RPSKA5, HAPGD, DAAM2 and PCOLCE2 were identified in the three studies. These five genes were analyzed in the string. A network of interactions was built between genes through this program. The analysis of the genes evaluated regarding the sensitivity and specificity based on the signal intensity of each sample through the SPSS 20.0 statistical tool. **Conclusion:** ARG1, HAPGD, DAAM2 and PCOLCE2 genes are involved in several sepsis -related intracellular pathways and have had good specificity and sensitivity. These results contribute to understanding the role of these genes in the sepsis and will help build a signature profile for early diagnosis and precise prognostic disease.

Keywords: sepsis; Biomarkers; Gene expression.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	Endotélio saudável e endotélio na sepse	18
<b>Figura 2-</b>	Mecanismo de Permeabilidade vascular	19
<b>Figura 3-</b>	Mecanismos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios atuantes na resposta imune	21
<b>Figura 4-</b>	Análise de enriquecimento dos três conjuntos de dados através da plataforma Enrichr	33
<b>Figura 5-</b>	Rede de interação entre os genes diferencialmente expressos	35

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1 -</b>	Interseção entre os três conjuntos de dados feito no diagrama de Venn .....	34
<b>Gráfico 2 -</b>	Análise de ontologia dos genes utilizando a Enciclopédia de Genes e Genoma de Kyoto (KEEG) dos 5 genes diferencialmente expressos, através da plataforma Enrichr.....	36
<b>Gráfico 3 -</b>	Análise de enriquecimento de vias intracelulares dos Processos biológicos que os 5 genes estão envolvidos, através da plataforma Enrichr.....	36
<b>Gráfico 4 -</b>	Análise de ontologia dos genes das funções moleculares dos 5 genes diferencialmente expressos, através da plataforma Enrichr.....	37
<b>Gráfico 5 -</b>	Análise de ontologia dos genes dos componentes celulares dos 5 genes diferencialmente expressos, através da plataforma Enrichr.....	37
<b>Gráfico 6 -</b>	Curva ROC dos resultados segundo sua sensibilidade e taxa de falsos positivos.....	38
<b>Gráfico 7 -</b>	Análise de sensibilidade e 1- especificidade do conjunto de genes identificados isoladamente.....	39

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1-</b>	Área sobre a curva de cada um dos genes.....	39
------------------	----------------------------------------------	----



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**ARG1** – Arginase 1

**ASL** - Argininosuccinato liase

**AUC** - Área sob a curva

**BPM** - batimentos por minuto

**DAAM2**- Ativador da morfogênese associado ao desalinhamento 2

**DNA**: Ácido desoxirribonucleico

**eNOS** Óxido Nítrico Sintetase endotelial

**ENRICH** - *European Network of Research and Innovation Centres and Hubs*

**FC** - *Fold Change*

**FrC** - frequência cardíaca

**FT** - Fator tecidual

**GDE** - Genes diferencialmente expressos

**GEO** - *Gene Expression Omnibus*

**HPGD**- 15-Hidroxi prostaglandina Desidrogenase

**ICAM** - *Intercellular Adhesion Molecule*

**IFN- $\gamma$**  - Interferon-Gam

**IL** - Interleucina

**IPM** - incursões por minuto

**KEEG** - Enciclopédia de Genes e Genoma de Kyoto

**MAPK** - Fosfocinase Ativada por Mitógeno

**MEWS** - *Modified Early Warning Scores*

**MHC** - complexo principal de histocompatibilidade, do inglês *Major Histocompatibility Complex*.

**MPO**- Mieloperoxidase

**NCBI** – Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia, do inglês *National Center for Biotechnology Information*.

**NF- $\kappa$ B** - fator nuclear  $\kappa$ B

**NK**- Natural killer

**NOS2**- Óxido Nítrico Sintase 2

**OAT**- Ornitina aminotransferase

**OTC**- Ornitina transcarbamilase

**PAMPs** – Proteínas moleculares associadas a patógenos

**PCOLCE2**- Intensificador de C-endopeptidase de procolágeno 2

**PC-r** – Proteína C reativa

**PCT** – Procalcitonina

**PGE2**- Prostaglandina E2

**PMN** - Granulócitos polimorfonucleares

**PPI**- Proteína-proteína

**ROC**- Características Operacionais do Receptor

**RPS6KA5**- Proteína Ribossomal S6 Quinase A5

**SOFA** – *Sequential Organ Failure Assessment*

**SOFA** – *Sequential Sepsis-related Organ Failure Assessment*

**TNF-a** – Fator de necrose tumoral alfa

**TRLs** – Receptor *Toll-likes*

**UTIs** - Unidade de terapia intensiva

**VCAM** - *Vascular Cell Adhesion Molecule*

# SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	3
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	9
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
2.1. Definição de Sepses.....	14
2.2. Fisiopatologia.....	16
2.3. Epidemiologia .....	21
2.4. Biomarcadores Laboratoriais .....	22
2.5. Papel das citocinas na sepsis .....	24
2.6. Papel de genes diferencialmente expressos como biomarcadores da sepsis.....	26
<b>3. HIPÓTESE.....</b>	<b>28</b>
<b>4. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>28</b>
4.1. Objetivos específicos.....	28
<b>5. METODOLOGIA E ESTRATÉGIA DE AÇÃO .....</b>	<b>28</b>
5.1. Análise de dados em repositórios públicos.....	28
5.2. Identificação de genes diferencialmente expressos (GDE) ....	31
5.3. Análise do enriquecimento de vias .....	31
5.4. Construção da rede .....	31
5.5. Análise de sensibilidade e especificidade.....	32
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
6.1. Identificação de genes diferencialmente expressos (GDE) ....	32
6.2. Enriquecimento de vias intracelulares dos dados GSE12624, GSE131761 E GSE69063.....	33
6.3. Identificação dos GDE .....	33

6.4. Enriquecimento de vias intracelulares dos 5 GDE (ARG1, RPS6KA5, HPGD, DAAM2 e PCOLCE2) .....	35
6.5. Análise de sensibilidade e especificidade.....	37
<b>6.5.1. Valores de sensibilidade e especificidade dos 5 GDE isoladamente.....</b>	<b>39</b>
6.6. Discussão .....	40
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>49</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A sepse é um problema de saúde pública mundial e representa a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo, em unidades de terapia intensiva não destinadas a pacientes cardiopatas, com um aumento vertiginoso em sua incidência no mundo (Singer M et al., 2016). Inicialmente, a sepse foi definida como uma condição clínica decorrente da disseminação sistêmica de uma infecção, provocando comprometimento de diversos órgãos associada à elevada morbidade e mortalidade (SALOMÃO et al., 2019).

A partir do início dos anos 90, atribuiu-se à sepse o conceito de uma síndrome decorrente de uma resposta inflamatória sistêmica à infecção e vários novos mecanismos apontaram para o envolvimento de repostas imunes inflamatórias e anti-inflamatórias. Estas seriam desencadeadas no início do processo com a participação de mediadores inflamatórios sem necessariamente envolver a disseminação do microrganismo. Contudo, a um avanço no conhecimento acerca dos mecanismos patogênicos da sepse, e maior precisão no diagnóstico e intervenções terapêuticas, asseguraram que a construção do conceito de sepse fosse um processo contínuo ao longo destes anos (PIERRAKOS et al., 2020).

A partir do início do século XXI, ao longo de 15 anos, foram acumulados novos conhecimentos sobre a fisiopatologia, os mecanismos imunológicos e bioquímicos relacionados à patogênese da doença, à intervenção terapêutica e à epidemiologia da sepse que resultaram em um novo conceito de sepse. Em 2016, a sepse passou a ser definida como disfunção orgânica com risco de vida, causada por uma resposta desbalanceada do hospedeiro à infecção, destacando que esta resposta não-homeostática do hospedeiro apresenta alta letalidade, necessitando de um diagnóstico precoce e uma intervenção específica e rápida (GUIRGIS et al., 2018).

As pesquisas realizadas ao longo destes anos também objetivaram definir critérios clínicos que melhor identificassem os pacientes infectados com maior risco de desenvolver sepse. Apesar de se ter elencado diversos critérios, estima-se que em 2017 cerca de 49 milhões de pessoas foram acometidas por sepse e que ocorreram aproximadamente 11 milhões de mortes em todo o mundo (SALES et al., 2006).

Portanto, ainda se faz necessário o desenvolvimento de ferramentas de

diagnóstico precoce e mais preciso, bem como de prognóstico, que permitam uma intervenção específica e célere nestes pacientes, garantindo um melhor prognóstico e prevenindo as disfunções múltiplas de órgãos, a elevada morbidade e a alta taxa de mortalidade. Neste contexto, de desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico rápidas, acessíveis e adequadas para melhorar a identificação, prevenção e tratamento da sepse, destaca-se o uso dos genes diferencialmente expressos como potenciais biomarcadores no diagnóstico e prognóstico da sepse (ZHANG et al.,2020).

Contudo, esta é uma etapa que exige muito estudo uma vez que parte significativa dos pacientes em sepse ou com alta probabilidade de evoluir para este quadro clínico tem comorbidades inflamatórias crônicas, tais como doença arterial coronariana, doença renal crônica, diabetes mellitus e doença autoimune (HEUNG M et al.,2015) o que implica em uma ampla variedade na expressão gênica de moléculas biomarcadores. Além disso, o patógeno responsável pela infecção primária influencia na expressão diferenciada destes biomarcadores, fazendo-se necessária a diferenciação da sepse infecciosa. Por isso, os biomarcadores despontam como elementos úteis a fim definir o perfil de pacientes com maior risco de evoluir para sepse e o possível prognóstico de disfunção orgânica, direcionando tratamento específico (SIMS et al., 2016).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Definição de Sepse**

A sepse é definida como uma disfunção orgânica de alto risco, ocasionada por uma resposta desregulada do sistema imunológico do hospedeiro à infecção, destacando que esta resposta não-homeostática pode levar o paciente à óbito. Essa infecção pode ser extremamente grave desde o início ou apresentar uma evolução de alta severidade porque não foi tratada ou não foi controlada adequadamente (Rhee C et al.,2019).

Nos casos de sepse descontrolada, o quadro vem acompanhado por anormalidades celulares e metabólicas, levando ao choque séptico configurado como uma condição de saúde, em quase totalidade dos pacientes de curso fatal. Mesmo as pessoas que sobrevivem a sepse ficam com sequelas irreversíveis. A

progressão das alterações fisiológicas que ocorrem na sepse em direção à hipoxemia e ao dano tecidual configura o choque séptico (CS) (PRADO et al., 2018).

Preliminarmente, as avaliações para identificação de sepse envolviam: hiper ou hipotermia (temperatura maior que 38°C ou inferior a 36°C), taquicardia que (Frequência Cardíaca superior a 90 bpm), pressão parcial de gás carbônico (pCO<sub>2</sub>) inferior a 32 mmHg, hiperventilação (acima de 20 incursões por minuto), contagem de células brancas (>12 x 10<sup>3</sup>/mL, < 4.0 x 10<sup>3</sup>/mL, ou >10% de células imaturas (ESPOSITO et al., 2017).

Na emergência eram utilizados para classificar a severidade da sepse a pontuação de avaliação da falha de órgãos sequencial (qSOFA) (Lo RSL et al., 2019). Trata-se de um índice aplicado para a avaliação inicial e progressiva de disfunções orgânicas em pacientes com sepse, sendo aplicado logo na admissão do paciente na internação e depois a cada 48 horas. Esta avaliação visa detectar alteração patológica em seis sistemas orgânicos diferentes do paciente, sendo atribuídos pontos. Quanto mais elevada a pontuação, pior é o indicativo de disfunção orgânica (SAITO A et al., 2023).

O diagnóstico preciso e precoce é de extrema importância para o quadro do paciente, pois a evolução da sepse é muito rápida. A sepse é determinada quando se tem a presença da infecção, combinada com variações agudas no escore SOFA de 2 pontos ou mais (CECCONI M et al., 2018). Contudo, o escore qSOFA é um sistema de baixa sensibilidade e especificidade para uma avaliação precoce, não sendo mais utilizado em triagem, uma vez que considera critérios clínicos e não utilizam exames laboratoriais. (ESPOSITO et al., 2017).

Atualmente, utiliza-se o escore de alterações de alerta precoce MEWS (do inglês *Modified Early Warning Scores*) que é baseado no monitoramento dos sinais vitais. Atribui-se uma pontuação de 0 a 3 a estes parâmetros de acordo com as alterações detectadas. A fim de diferenciar a sepse de outras doenças que apresentam quadro clínico semelhante, a análise laboratorial é fundamental contribuindo para uma conduta médica adequada e, conseqüentemente, melhor prognóstico. Na rotina laboratorial, a utilização dos resultados de Proteína C Reativa (PCR), procalcitonina (PCT), contagem global dos leucócitos, contagem dos neutrófilos e suas formas imaturas auxiliam na intervenção médica em situação de sepse. Contudo, estes exames não detectam a sepse precocemente ou auxiliam no

prognóstico. (CANDEL et al., 2018).

## **2.2. Fisiopatologia**

Os sítios de infecção mais comuns são os tratos: urinário, gastrointestinal e respiratório. O processo tem início com estímulos à imunidade inata que ocorrem após a entrada de microrganismos na corrente sanguínea sendo eles fungos, vírus ou principalmente bactérias. No desenvolvimento da sepse, destacam-se os receptores Toll- like (TLRs), proteínas transmembranas responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPS) e fundamentais para estimular a ativação das respostas imunes inata (BLASIUS AL et al.,2013).

Esta classe de receptor apresenta vários tipos de TLRs, cada um com atribuições específicas para determinado componente microbiano. Uma vez estimulados, estes receptores ativam vias de sinalização intracelular que culminam com a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e outros mediadores inflamatórios a fim de controlar o patógeno, recrutar outras células efetoras do sistema imune como neutrófilos e monócitos circulantes para o local da infecção e induzir o reparo tecidual (FERRAZ et al; 2011).

A resposta do hospedeiro ao patógeno pode levar à inflamação, mas na sepse essa resposta é exacerbada e caracterizada por produção excessiva de mediadores inflamatórios, ativação do sistema complemento, ativação de fatores de coagulação e hiperatividade celular. Embora alguns pacientes sépticos sobrevivam a esta fase hiperinflamatória, eles ainda apresentam um risco aumentado de desenvolvimento de inflamação secundária persistente devido à imunossupressão de longo prazo induzida pela sepse (CUI S et al, 2022). A ativação de fatores de coagulação que consiste na ativação de uma cascata de proteases, acompanhada da inibição da fibrinólise, eleva à formação de trombos juntamente com maior deposição de fibrinas e aumento da ativação plaquetária (IBA T et al.,2021).

De modo específico, as plaquetas têm como função bem estabelecida a manutenção da hemostasia, uma vez ativadas e aderidas ao endotélio, a superfície das plaquetas oferece um sítio catalítico para fatores de coagulação. Desta forma, auxiliando no mecanismo de retenção do agente patogênico no sítio de infecção através da formação das redes de fibrina. Quando o organismo não consegue



resolver esta inflamação exacerbada, há o comprometimento de um ou vários órgãos com risco elevado de morte. Não é o patógeno em si, mas sim a resposta descontrolada do hospedeiro que é responsável pelo desenvolvimento da sepse. (BERG, 2018). Isto representa o desequilíbrio entre as respostas inflamatória e anti-inflamatória, agravando o quadro do paciente. (HOTCHKISS et al., 2009).

Associada ao quadro inflamatório tem-se a alteração vascular caracterizada por a baixa perfusão sanguínea tecidual, gerando a isquemia. Esta alteração decorrente da inflamação exacerbada inclui também a disfunção endotelial e a diminuição da produção de óxido nítrico, acentuando a lesão tecidual. A ativação do endotélio modula mecanismos da resposta imune como secreção de prostaglandinas e tromboxano, com a elevação dos níveis de expressão das moléculas de adesão e dos fatores de coagulação (DOLMATOVA EV et al., 2021).

A ativação de mecanismos é acompanhada do aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, potencializando a migração de células imunológicas para o local da infecção mediada pelos agentes quimiotáticos. Como consequência, tem-se a liberação de substâncias vasoativas. A lesão endotelial é a peça-chave no estabelecimento das disfunções orgânicas decorrentes da sepse (Figura 1). Agravando este cenário, tem-se o acúmulo de espécies reativas de oxigênio que provoca danos mitocondriais e a ativação das cascatas intracelulares ligadas à apoptose acentuado pelo baixo nível de ATP (JACOBI et. al., 2021).

As moléculas de adesão expressas na superfície das células leucocitárias são glicoproteínas tais como as selectinas, e as integrinas. As integrinas são moléculas de adesão celular envolvidas na adesão célula-matriz extracelular e na comunicação celular, enquanto as selectinas são moléculas de adesão envolvidas na adesão e migração de leucócitos através das paredes dos vasos sanguíneos, daí desempenharem um papel importante na resposta imune inflamatória do corpo. (RANKIN et al., 2004).

As selectinas estão envolvidas na interação célula-célula e na regulação da adesão e migração celular, durante o recrutamento e rolamento leucocitário. Estas moléculas medeiam a adesão inicial de leucócitos às células endoteliais ativadas ou plaquetas, através do reconhecimento de moléculas de ligação específicas, como os glicanos (carboidratos) presentes na superfície celular (Figura 2). Esse processo é conhecido como rolamento e é essencial para o recrutamento e direcionamento de

células inflamatórias aos locais de inflamação. Estas proteínas são expressas na superfície de células endoteliais (selectinas endoteliais) e em células envolvidas na resposta imunológica, como leucócitos (selectinas leucocitárias). Existem três tipos principais de selectinas: E-selectina (Endotelial), P-selectina (Plaquetária) e L-selectina (Leucocitária) (IVETIC et al., 2019).

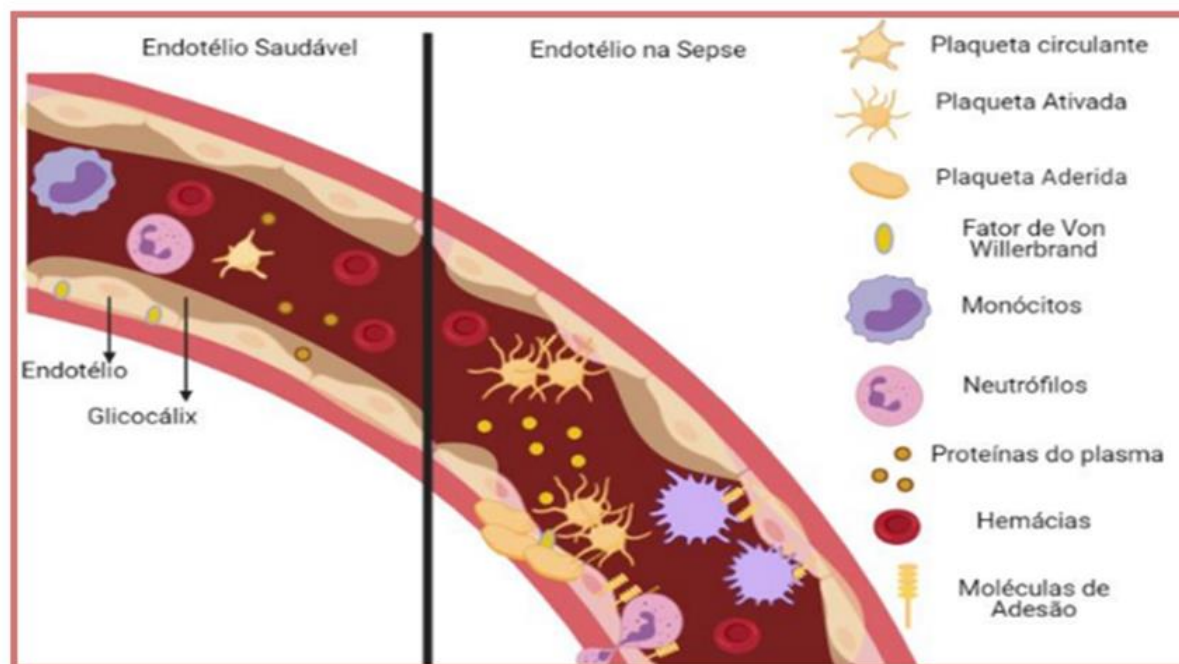


Figura 1: Endotélio saudável e endotélio na sepse. A ativação e o dano endotelial ocorrem precocemente durante a sepse e desempenham um papel importante na fisiopatologia da inflamação sistêmica. Vários marcadores de ativação endotelial são aumentados durante a sepse, observam-se distúrbios de quase todos os elementos celulares da microcirculação, incluindo , degradação do glicocálice, células endoteliais , eritrócitos, leucócitos, plaquetas e a presença de moléculas de adesão. (Fonte: Biorender)

As integrinas são uma família de proteínas que também desempenham um papel crucial na adesão celular, na interação célula-matriz extracelular e na comunicação celular. Elas estão presentes na superfície das células e atuam como receptores de ligação para proteínas da matriz extracelular, como colágeno, fibronectina e laminina. Além disso, as integrinas também podem interagir com moléculas de adesão presentes em outras células (KECHAGIA JZ et al., 2019).

Estas moléculas são heterodímeros compostos por uma cadeia alfa e uma cadeia beta, e existem várias combinações possíveis dessas cadeias, resultando em diferentes tipos de Integrinas. Essas combinações de cadeias alfa e beta conferem especificidade de ligação e função às integrinas, desempenhando um papel

fundamental na adesão e migração celular durante processos fisiológicos, como a cicatrização de feridas, a resposta imunológica e a formação de vasos sanguíneos (GAUTHIER NC et al.,2018)

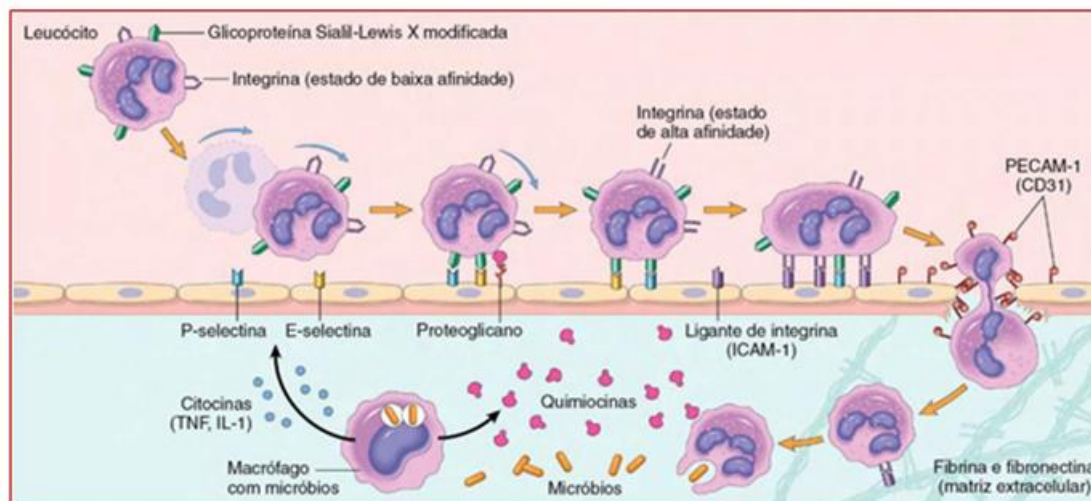


Figura 2 - Mecanismo de Permeabilidade vascular. (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI; 2015; KUMAR et al., 2013)

As moléculas de adesão pertencentes à subfamília das imunoglobulinas envolvidas na adesão e migração entre leucócitos e células endoteliais, induzida por citocinas inflamatórias, são chamadas de moléculas de adesão intercelular (ICAM). As ICAM são proteínas expressas nas células endoteliais e em algumas células do sistema imunológico, como leucócitos, regulada positivamente por estímulos inflamatórios. Elas desempenham um papel crucial na adesão e migração dos leucócitos através das paredes dos vasos sanguíneos (SINGH V et al.,2023).

As principais ICAMs envolvidas nesse processo são ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), ICAM-3 (CD50), ICAM-4 (CD242), ICAM-5 (CD14), entre outras (DE SOUSA J ET AL.,2017). As moléculas de adesão celular vascular (VCAM). são expressas nas células endoteliais ativadas e são importantes para a adesão de leucócitos, especialmente linfócitos, durante a resposta inflamatória. A VCAM-1 (CD106) é uma das principais VCAMs envolvidas na adesão e migração dos leucócitos, exercendo um papel essencial na captura e recrutamento de leucócitos para o local de inflamação (LAWSON et al., 2009).

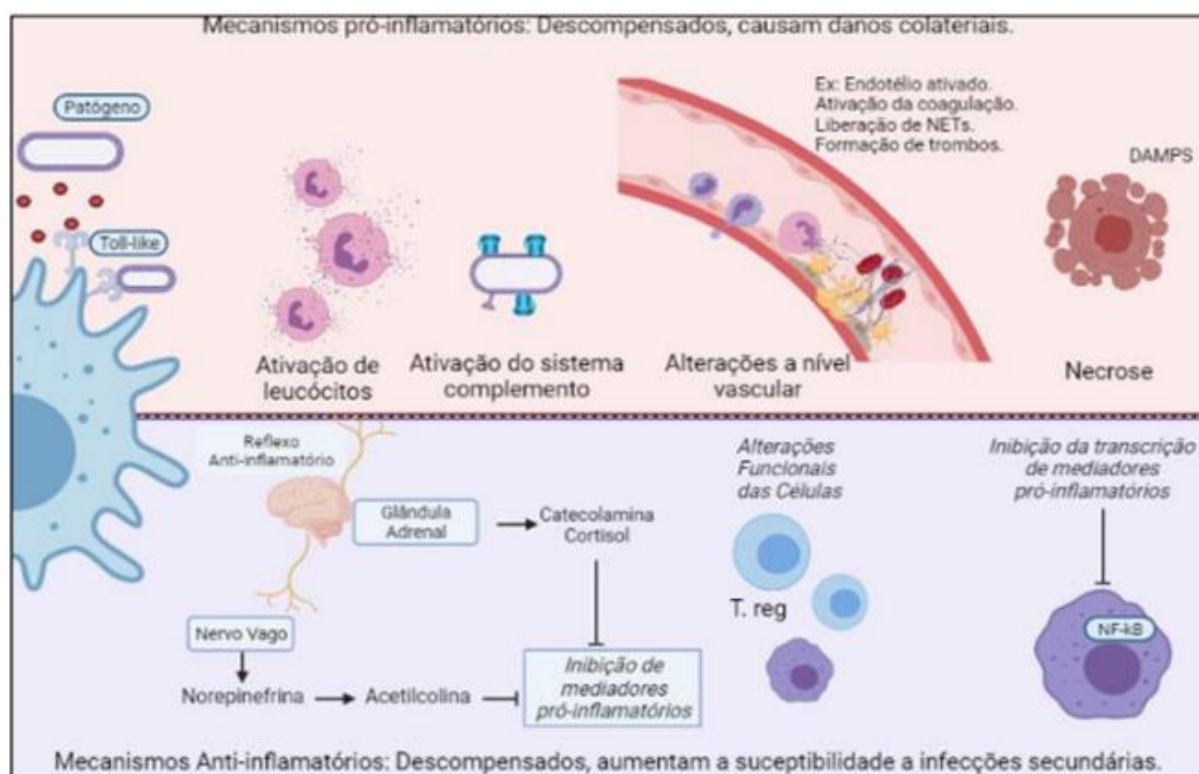
Quando ocorre uma lesão tecidual os macrófagos e células dendríticas presentes no tecido, atuam na eliminação desses antígenos através da fagocitose, e da produção de citocinas pro-inflamatórias como TNF e interleucina (IL-1) a fim de recrutar mais células de defesa para combater patógenos no local da lesão. Durante

a diapedese, uma das células que migram com maior frequência para os tecidos são os neutrófilos (polimorfonucleares). Estas células fagocitárias destroem os microrganismos através de uma explosão da respiração celular, promovendo a alta produção de espécies reativas de oxigênio com função bactericida, contribuindo efetivamente para a homeostase tecidual (Qi X et al.,2021)

Na sepse, a liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias pelas células do sistema imune que migram para local da lesão desempenha um papel crucial na resposta inflamatória sistêmica e nas alterações hemodinâmicas (Figura 3). Essas citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6), podem causar várias consequências hemodinâmicas na sepse. (DOGANYIGIT Z et al.,2022)

Resumidamente, a vasodilatação leva à diminuição da resistência vascular periférica e, subsequentemente, à queda da pressão arterial; o aumento da permeabilidade vascular promove o extravasamento de líquido para os tecidos circundantes, levando à formação de edema e à diminuição do volume intravascular efetivo, contribuindo para a hipotensão na sepse. Cabe ressaltar que esta resposta inflamatória sistêmica promove a disfunção contrátil cardíaca, promovendo a redução do débito cardíaco e, conseqüentemente, baixa perfusão tecidual (RUSSEL, C. et al.,2019)

Além disso a ativação do sistema de coagulação resulta na formação de inúmeros coágulos sanguíneos, obstrução dos vasos sanguíneos, agravando a disfunção circulatória e acentuando a diminuição do fluxo sanguíneo para os órgãos (IBA T et al.,2020). A perfusão diminuída causa disfunção e, às vezes, falência de um ou mais órgãos, incluindo rins, pulmões, fígado, encéfalo e coração. Essas alterações hemodinâmicas na sepse podem levar a uma condição de choque, conhecida como choque séptico, caracterizada por uma queda significativa da pressão arterial e disfunção orgânica. O tratamento adequado da sepse e do choque séptico envolve a estabilização hemodinâmica, com a administração de fluidos intravenosos, suporte pressórico e, em alguns casos, o uso de medicamentos vasoativos para melhorar a função cardiovascular. (SINGER M et al., 2016).



**Figura 3- Mecanismos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios atuantes na resposta imune. O direcionamento equilibrado dos mediadores pró e anti-inflamatórios são influenciados por fatores associados ao hospedeiro e as características da infecção. O início da resposta imune ocorre por reconhecimento de imunógenos por receptores de membrana, do citosol ou em endossomos, que desencadeia a ativação dos mediadores voltados para eliminação do patógeno como ativação e recrutamento de celular efectoras, início da cascata do sistema complemento e do sistema de coagulação. A perda de equilíbrio do eixo pró inflamatório pode levar ao dano do tecido e a morte celular por necrose. Os reflexos anti-inflamatórios descompensados, podem prolongar a dependência dos pacientes aos cuidados da terapia intensiva, apresentando sinais de imunossupressão e aumentando o risco de adquirir infecções secundárias. (Fonte: Medicinanet)**

### 2.3. Epidemiologia

A sepse é uma doença severa e representa um grave problema de saúde pública mundial, uma das condições de maior ônus econômico por pacientes hospitalizados (RUDD KE et al.,2020). Apesar das intensas investigações, ainda há uma lacuna no diagnóstico precoce e preciso, bem como no prognóstico deste quadro clínico, permanecendo como um desafio relevante e crescente à assistência médica. Nas unidades de terapia intensiva um terço dos leitos são ocupados com pacientes com sepse, apresentando letalidade global de 55%. (SIQUEIRA et al., 2011).

Em 2017, estimou-se que cerca de 20% de todas as mortes anuais no mundo foram decorrentes de sepse com etiologias diversas. A taxa de mortalidade para pacientes de UTI tratados para sepse é estimada em 42%. Entre os adultos

que sobreviveram à sepse, um em cada três morreu dentro de um ano e um em cada seis teve morbidade significativa a longo prazo. Neste cenário, a sepse configura-se como é um grande problema de saúde tanto para o mundo em desenvolvimento quanto para o desenvolvido. (WHO et al., 2020).

A ocorrência no Brasil é de aproximadamente 200 mil casos a cada ano, com uma mortalidade entre 35 e 45% para sepse. Foram registradas um total de 615.805 internações no Brasil entre os anos de 2017 e 2021 associadas à sepse. Na região sudeste ocorreu o maior número de casos, foram 316.469 (51,39%) e a região centro-oeste registrou um menor número de casos, foram 29.425 (4,78%). (SILVA LINS et al.,2022)

O aumento dos casos de sepse se deve também a um número relevante de pessoas com imunodeficiências, alta incidência de infecções hospitalares, baixo acesso a unidades básicas de saúde, higiene inadequada, ao aumento dos microrganismos multirresistentes e envelhecimento da população, pois a maioria dos casos de sepse ocorre em pessoas com mais de 65 anos (BORGES et al., 2019).

#### **2.4. Biomarcadores Laboratoriais**

O desafio do diagnóstico rápido da sepse deve-se ao fato da evolução desta síndrome envolver vias fisiopatológicas de alta complexidade que podem apresentar sinais e sintomas clínicos variados. Não existe teste padrão-ouro para diagnóstico de sepse, ou seja, ainda não se tem um exame que seja específico e sensível para essa doença. Muitos biomarcadores são usados na prática clínica para ajudar os médicos no diagnóstico da sepse e na previsão do resultado. Eles são amplamente utilizados na prática clínica para monitorar o processo infeccioso ou para descartar infecção. (ESPOSITO et al.,2017)

Os biomarcadores como: PC-r (Proteína C reativa), procalcitonina (PCT), citocinas, contagem global dos glóbulos brancos e de neutrófilos, contagem de células imaturas, dosagem de lactato são rotineiramente utilizados em pacientes com suspeita de sepse, mas esses parâmetros laboratoriais podem estar elevados em pacientes que sofreram trauma cirúrgicos ou acidentes tanto quanto dos indivíduos em quadro infeccioso, como na sepse. (CANDEL et al., 2018).

A PC-r é um biomarcador de fase aguda bastante utilizado para detectar a presença de processos inflamatórios ou infecciosos (RAGÁN D et al.,2022). Em

resposta à alguma inflamação ou infecção, tem sua síntese aumentada no fígado sendo regulada positivamente pela IL-6. Contudo, sua especificidade para o diagnóstico de sepse é baixa, pois em outras doenças inflamatórias, como artrite reumatoide, lúpus, pneumonia, asma, febre reumática e pós-operatório. A PC-r também pode estar elevado. (VAN ENGELEN, 2018).

O hemograma tem grande importância clínica, principalmente na sepse, pois, mostra a contagem de leucócitos em casos de infecção (DENSTAEDT SJ et al.,2023). As alterações hematológicas que acontecem na sepse são rapidamente visualizadas em um hemograma, caracterizando-se por leucocitose, trombocitopenia e presença de leucócitos imaturos, principalmente os neutrófilos com núcleos em forma de bastão (bastonetes), indicando uma resposta compensatória da medula óssea em liberar células imaturas para combater a infecção. (CANDEL et al., 2018).

A trombocitopenia em pacientes com sepse ocorre por estar relacionada com o a elevada perda e distribuição plaquetária causada pela ativação plaquetária estimulada por bactérias ou suas toxinas. (GAO Q et al 2021)

Pode ocorrer também a disfunção dos linfócitos circulantes durante a sepse caracteriza-se por linfopenia significativa e diminuição dos linfócitos CD4+, células T CD8+, células natural killer (NK) e células B, agravando o quadro clínico do paciente (GIZA DE et al., 2016).

O lactato é um metabólito da glicose e marcador de hipoxia tecidual. Quando ocorre um processo inflamatório ou infeccioso, haverá o aumento na produção de lactato decorrente da baixa perfusão associada à hipotensão e à diminuição do débito cardíaco, reduzindo expressivamente o aporte de oxigênio aos tecidos. (DAL MAGRO et al.,2020)

A creatinina é um composto químico produzido a partir do metabolismo da creatina pelo músculo, liberada na corrente sanguínea e filtrada pelos rins para ser excretada na urina. Os níveis de creatinina no sangue são geralmente usados como um indicador da função renal. Na disfunção renal, a excreção de creatinina está comprometida, resultando em níveis elevados de creatinina no sangue, levando a complicações sistêmicas. Quando há uma hipoperfusão tecidual, como por exemplo durante a sepse, este acúmulo de creatinina acentua a disfunção celular e, posteriormente, contribui para a falência dos órgãos. (ILAS, 2020).

A PCT é um peptídeo precursor direto da calcitonina (hormônio que regula o

metabolismo do cálcio), sintetizada pela glândula tireoide e liberada pelas células parafoliculares (células C) do parênquima em pequenas quantidades. Em resposta à presença de toxinas bacterianas liberadas durante infecções graves, como na sepse, a PCT é produzida em quantidades significativamente maiores em vários tecidos e células, incluindo células do sistema imune, como macrófagos e células mononucleares. Destaca-se sua ação quimiotática e modulação da liberação e produção do óxido nítrico sintetase (eNOS), citocinas pro-inflamatórias e de outros mediadores inflamatórios (PERNER et al., 2016).

Apesar da medição dos níveis de PCT no sangue ser útil na avaliação de pacientes com suspeita de sepse, estes níveis tendem a aumentar rapidamente durante a resposta inflamatória do organismo à infecção bacteriana e, normalmente, permanecem baixos em infecções virais ou de origem não bacteriana. A monitorização dos níveis de procalcitonina ao longo do tempo também pode ser útil para avaliar a eficácia do tratamento antibiótico, pois uma diminuição nos níveis de procalcitonina pode indicar uma melhora na resposta à terapia. No entanto, é importante ressaltar que a procalcitonina não é um fator diagnóstico definitivo para infecção bacteriana e deve ser interpretada em conjunto com outros dados clínicos e exames laboratoriais. O uso da procalcitonina como biomarcador é uma ferramenta complementar na avaliação de pacientes com suspeita de infecção bacteriana grave (BLOOS, Frank et al., 2013).

## **2.5. Papel das citocinas na sepse**

Na sepse, o sistema imunológico é continuamente ativado, resultando em uma resposta inflamatória exacerbada e marcada por grande liberação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Quando há o desequilíbrio entre esses dois processos, pode ocorrer uma cascata de eventos prejudiciais ao organismo, levando a sepse. (MINASYAN, 2019).

Pode-se destacar como as principais citocinas pró-inflamatórias o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  e a IL-6. Além destas citocinas inflamatórias propriamente ditas, destaca-se outro elemento importante nesta cascata imune que é o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, responsável pela modulação da transcrição de genes responsáveis pela expressão de mediadores inflamatórios, também, envolvidos na tempestade de citocinas, inflamação sistêmica e desenvolvimento de sepse. O NF- $\kappa$ B também ativa a



expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2), bem como iNOS induzível. O papel significativo do NF- $\kappa$ B na resposta inflamatória e imune o torna um possível alvo para intervenções terapêuticas farmacológicas destinadas a prevenir danos a múltiplos órgãos no curso da sepse (ULLOA et al.,2005).

A primeira citocina mediadora da inflamação a ser produzida é o TNF- $\alpha$  que induz a proteção local, fazendo parte do sistema imune inato. Sua ação foca na supressão do crescimento de microrganismos patogênicos na circulação sanguínea. A produção exacerbada do TNF- $\alpha$  pode ocasionar o desequilíbrio na resposta imune, estimulando a ativação elevada de outras citocinas. Como consequência há maior risco de inflamação severa, exacerbação do estresse oxidativo, lesão celular, aumento da permeabilidade vascular, hipotensão e a coagulação intravascular e outras alterações hemodinâmicas e metabólicas que culminam na disfunção orgânica sistêmica (CIANCIARULLO et al.,2008).

A IL-1 $\beta$  é uma citocina que eleva a temperatura do corpo, por isso que a maioria dos casos de infecção ou inflamação, ocorre a febre, até porque a resposta imune mediada pelos linfócitos age com mais eficácia a uma temperatura mais elevada. Também estimula a hipotensão e induz a expressão de moléculas de adesão pela ativação de células endoteliais, que é necessário para ascensão de leucócitos. Na sepse, a IL-1 $\beta$  age, primeiramente, sobre os vasos sanguíneos, provocando a vasodilatação por intermédio da produção rápida do fator ativador de plaquetas, prostaglandinas e óxido nítrico (KUMAR et al.,2020).

A IL-6 é uma importante citocina na resposta inflamatória sistêmica, pois quando se tem uma exacerbação do quadro infeccioso, esta alcança rapidamente elevados níveis de concentração plasmática no organismo, sendo conhecida como citocina de alarme. Também está presente em níveis elevados durante a febre. É responsável por funções importantes na diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos e, conseqüentemente, na produção de anticorpos. Atua na indução de proteínas na inflamação e controle do metabolismo do corpo. Nos hepatócitos, a IL-6 age disseminando o processo inflamatório, como por exemplo potencializando a secreção de fibrinogênio. (CHRISTOPHER et al.,2019). IL-6 apresenta-se diminuída em pacientes onde a infecção é controlada, sendo preditivo de sobrevida. No entanto, assim como para outros biomarcadores de sepse, vários estímulos não infecciosos também podem induzir a liberação de IL-6, como cirurgias (SCHAIKOWSKY et al.,

2011).

A IL-8 é uma quimiocina produzida por macrófagos e monócitos e em menor quantidade pelos fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, melanócitos, hepatócitos e condrócitos, podendo ser estimulada pela IL-1 e pelo TNF- $\alpha$ . É uma proteína de sinalização, que atrai e recruta outras células imunes para o sítio infeccioso, a exemplo da atração de neutrófilos para o local da lesão. Porém, na sepse pode levar inflamação exacerbada e danos teciduais, devido ao recrutamento excessivo de neutrófilos, ativação de células NK e células dendríticas e estimulação da produção de outras citocinas pró-inflamatórias. (CILIA., 2018)

As citocinas anti-inflamatórias liberadas durante este processo incluem a IL-4, IL-10, IL-13. A IL-10 é a principal citocina contrarreguladora da resposta imune inata. Atua como citocina anti-inflamatória para inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Porém, quando ocorre a liberação exacerbada de citocinas anti-inflamatórias, pode levar a imunossupressão que é reconhecida como uma das principais causas de morte séptica (Liu D et al.,2022).

A IL-10 é um polipeptídeo, sintetizado em células imunológicas, o aumento nas concentrações de IL-10 diminui a síntese de TNF- $\alpha$ ; IL-1; IL-6 e IL-8 pelos monócitos, durante o tempo que ativam a produção de IL-1Ra. A redução dos níveis de IL-10 possibilita a elevação dos níveis séricos circulantes de TNF- $\alpha$  e IL-6, reforçando o seu papel anti-inflamatório, já tendo sido demonstrada que a neutralização da IL-10 endógena por anticorpos monoclonais aumenta a mortalidade por sepse (CIANCIARULLO et al.,2008).

## **2.6. Papel de genes diferencialmente expressos como biomarcadores da sepse**

Um biomarcador de uma doença específica é uma molécula que geralmente pode ser mensurada no sangue, urina, tecidos ou outros fluidos biológicos, estando associada a um determinado estado ou condição de saúde. Pode ser medida ou detectada por meio de técnicas laboratoriais, servindo como um indicador objetivo e quantificável do diagnóstico, progressão, resposta ao tratamento ou prognóstico da doença. Essas moléculas podem ser proteínas, ácidos nucleicos, metabólitos ou outras substâncias que refletem alterações fisiológicas, patológicas ou bioquímicas associadas à doença (PÓVOA et al.,2023)

Na sepse o conceito e a finalidade do biomarcador não mudam, objetivando auxiliar no diagnóstico precoce, estratificação de risco, monitoramento do estado clínico do paciente e orientação da conduta terapêutica. Apesar dos exemplos de biomarcadores comumente utilizados na sepse citados anteriormente fornecerem informações clínicas relevantes, a falta de especificidade e sensibilidade destas moléculas como biomarcadores para sepse impulsiona as pesquisas em busca de um biomarcador preciso e eficaz (PARLATO et al.,2018)

A análise de expressão gênica que possibilita a investigação da expressão de milhares de genes em uma amostra com uma reação de hibridação, que influenciam o conjunto de reconhecimento de patógenos e as vias de sinalização inflamatória e que caracterizam a sepse. Alguns tipos de biomarcadores úteis foram encontrados com características específicas, que em alguns casos, tendem a evitar necessidade de análises em todo o genoma, possibilitando a aplicação da análise de expressão gênica na clínica. (DAVID M. MASLOVE; E HECTOR R. WONG., 2014)

Atualmente, a expressão de genes tem sido utilizada para detectar assinaturas gênicas de diagnóstico e prognóstico, assim como para direcionar o manejo terapêutico do paciente. As investigações de séries temporais apresentaram mudanças rápidas e práticas nos padrões de transcrição relacionadas às várias fases da sepse. Essas evidências destacam os desafios atuais na tradução do conhecimento sobre sepse, incluindo a necessidade de adaptar métodos complexos e demorados de todo o genoma. (MING T et al., 2022).

Caracterizada por ser responsável por disfunções fisiológicas decorrentes da infecção bacteriana, a resposta imune inata está intimamente ligada à expressão modificada de mais de 3.700 genes, transformando o estudo da expressão gênica um recurso potencialmente benéfico para estudos voltados à descoberta da patogenia da sepse e infecção grave. Os achados publicados com embasamento nesse paradigma de pesquisa estão crescendo. Além de que, os dados de expressão estão disponíveis em repositórios públicos e a alguns ensaios clínicos (ZHANG et al, 2020).

As pesquisas com biomarcadores representam uma área dinâmica e em permanente evolução. Já foram identificados cerca de 250 biomarcadores de inflamação e infecção nos últimos anos, mas nenhum desses biomarcadores foram estabelecidos e validados clinicamente para sepse. A relevância deste tema é

destacada pela OMS em 2020, quando da solicitação por uma ação global contra a sepse e entre estas diretrizes está o desenvolvimento de ferramentas para diagnóstico específico, rápido, acessível.

### **3. HIPÓTESE**

A análise dos genes diferencialmente expressos em pacientes com suspeita de sepse representa uma ferramenta de diagnóstico precoce e prognóstico preciso.

### **4. OBJETIVO GERAL**

Estudar o perfil de expressão dos genes e sua correlação com as vias intracelulares moduladas por citocinas e fatores de crescimento associadas à progressão e severidade da sepse.

#### **4.1. Objetivos específicos**

- Identificar o perfil de expressão dos genes em conjunto de dados públicos de pacientes com sepse.
- Identificar as vias de sinalização intracelulares associadas ao desenvolvimento da sepse.
- Identificar genes-alvos implicados nas vias de sinalização da sepse.
- Avaliar a especificidade e sensibilidade dos genes diferencialmente expressos como biomarcadores para sepse.

### **5. METODOLOGIA E ESTRATÉGIA DE AÇÃO**

#### **5.1. Análise de dados em repositórios públicos**

As análises de banco de dados (séries) de perfil de expressão por microarray foram obtidas do repositório público do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/datasets/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/datasets/)) e viabilizados através do Gene Expression Omnibus (GEO) datasets, a busca de dados foram feitas de agosto a dezembro de 2021. Estes repositórios públicos de dados fornecem o acesso a informações biomédicas e genômicas funcionais contendo matriz e dados baseados em sequência. Os termos de busca utilizados na pesquisa foram: “Sepsis, Genes Human”. A partir desta pesquisa, foram selecionados três conjuntos de dados de

Sequenciamento, o GSE12624, GSE131761 e GSE69063, dos três conjuntos de dados o único que foi publicado foi o GSE131761. Cada banco de dados é reconhecido como uma série e recebe a identificação GSE e a plataforma de microarray recebe a identificação GPL. Esses três estudos foram escolhidos para análise, pois, todos contêm expressão gênica completa de amostras de sangue periférico, permitem a criação de perfil de expressão por *array*, os três estudos são de países diferentes.

O perfil de expressão por sequenciamento de alto rendimento do conjunto de dados GSE12624, com base na plataforma GPL4204, que continha 70 amostras de pacientes traumatizados consecutivos, no momento da admissão na unidade de terapia intensiva (UTI), os critérios de inclusão para esse estudo foi: lesões graves em pelo menos duas regiões do corpo ou três fraturas graves, idade entre 18 e 65 anos, idade estimou Injury Severity Score (ISS)  $\geq 15$  pontos após avaliação minuciosa das lesões, <12 horas entre a ocorrência do acidente e o momento da admissão na UTI e pelo menos superior a 3 dias de sobrevivência. Nenhum dos pacientes foi submetido a cirurgia neurológica ou cardíaca. Foram excluídos pacientes com traumatismo craniano intracraniano grave, anomalias de coagulação conhecidas no dia da admissão na UTI, insuficiência renal aguda, insuficiência hepática, doença maligna ou hemofiliação na história do paciente.

Utilizamos para esse estudo 2 grupos: controle (CON) com n=36, complicado por sepse (SEPSE) com n=34 As amostras foram obtidas do sangue periférico humano coletado com o sistema PAXgene, esse estudo foi realizado na Alemanha (THIERER FJ et al.,2012). Esse estudo consiste na análise da expressão gênica em pacientes politraumatizados comparando sepse versus não sepse, um estudo prospectivo realizado 12 horas após o trauma. Para análise do transcriptoma, foi feito o monitoramento dos pacientes e a sequência de eventos desde a admissão na UTI até o início da sepse e, finalmente, no desenvolvimento pleno da síndrome de disfunção de múltiplos órgãos. O objetivo foi contribuir para a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos e bioquímicos que levam ao desequilíbrio do funcionamento do sistema imune do hospedeiro na sepse.

O segundo conjunto de dados obtido no NCBI e GEO, foi o GSE131761, com base na plataforma GPL13497 Trata-se de *microarray* do genoma humano com 129 amostras de sangue periférico, e refere-se ao bioprojeto PRJNA544706 intitulado

“Padrões de expressão gênica em pacientes pós-cirúrgicos de choque séptico e não séptico” (Martínez-Paz P ET AL.,2021). Com o objetivo de propor um conjunto de genes candidatos como padrão-ouro para ajudar na distinção de ambas as condições, foram avaliados 2 grupos: um grupo controle com 15 amostras, um grupo choque séptico com 81 amostras. O trabalho foi realizado na UTI do Hospital Clínico Universitario de Valladolid (Espanha) com duas coortes de estudo de adultos pacientes após cirurgia recrutados sequencialmente entre janeiro de 2014 e dezembro de 2018 com diagnóstico de choque séptico e choque não séptico por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real. Quinze voluntários saudáveis de idades semelhantes às dos pacientes foram recrutados para normalização dos dados de expressão gênica.

O terceiro estudo utilizado foi o GSE69063. com base na plataforma GPL19983. É um *microarray* do genoma humano com 153 amostras, e refere-se ao bioprojeto PRJNA284417 intitulado “Padrões de expressão gênica no sangue durante a anafilaxia humana, trauma e sepse”. Os pacientes foram recrutados em três departamentos de emergência australianos (ED) entre março de 2011 e junho de 2013. As amostras foram coletadas na chegada ao ED (T0), 1 hora depois (T1) e 3 horas após a chegada (T2). O delineamento experimental do estudo consistiu em quatro fenótipos (anafilaxia, sepse, trauma e controles saudáveis) e até 3 pontos no tempo. Controles saudáveis foram pareados com pacientes dentro de cada estudo. A análise apenas do fenótipo de doença (sepse) foi realizada com 19 amostras e 14 amostras controle saudáveis no momento T0. Este estudo foi realizado na Austrália, e a última atualização foi em setembro de 2021.

Após seleção dos conjuntos de dados foram feitas análises individuais para cada data set feita no GEO2R, ferramenta que permite comparar dois ou mais grupos de amostras em uma série GEO para identificar genes que são expressos diferencialmente em condições experimentais. Os resultados desta análise são apresentados como uma tabela de genes ordenados por significância pelo  $p$  valor e como uma coleção de gráficos para ajudar a visualizar genes expressos diferencialmente e a avaliar a qualidade do conjunto de dados. O GEO2R utiliza elementos para o ajuste aos valores  $p$ : *Limma* e *DESeq* fornecem várias opções de ajuste de valor  $p$ . Esses ajustes, também chamados de correções, tentam reparar a ocorrência de resultados falsos positivos. O método de *taxa de descoberta falsa de*

*Benjamini & Hochberg* é selecionado por padrão porque fornece um bom equilíbrio entre a descoberta de genes estatisticamente significativos e a limitação de falsos positivos.

## **5.2. Identificação de genes diferencialmente expressos (GDE)**

Após a conversão para o Excel dos três conjuntos de dados GSE12624, GSE131761 e GSE69063 foram considerados os genes diferencialmente expressos que possuíam um p-valor  $<0,05$  e cuja expressão apresentou Fold Change (FC) menor que -1,1 ou maior que +1,1. Desta forma, esta ferramenta permite a análise de dados genômicos de alto rendimento, comparando a expressão dos Genes Diferencialmente Expressos (GDE) entre os grupos de indivíduos saudáveis e acometidos por sepse. E Através da ferramenta Biomart disponível no *ENSEMBL* (<https://www.ensembl.org>), por meio de um arquivo txt contendo a lista de ID dos genes foi possível identificar os nomes dos genes.

## **5.3. Análise do enriquecimento de vias**

Os genes foram analisados segundo o programa de enriquecimento de vias Enrichr (disponível em: <https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) para verificar se a expressão gênica dos indivíduos é consistente com a doença estudada. A ontologia de genes foi gerada a partir da expressão dos genes únicos, utilizando essa ferramenta para a interpretação de listas de genes derivadas de estudos ômicos em larga escala. Enrichr é um popular mecanismo de pesquisa de servidor web para análise de enriquecimento de conjuntos de genes que contém centenas de milhares de conjuntos de genes anotados.

Posteriormente, foi realizado o agrupamento da rede com auxílio da construção do diagrama de Venn disponível na plataforma: <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. Com esta ferramenta foi possível comparar os três estudos com os genes diferencialmente expressos e calcular as interseções da lista de elementos. Foi gerada uma saída textual indicando quais elementos estão em cada interseção, para visualizar facilmente caminhos comuns e únicos através de diferentes análises e subtipos

## **5.4. Construção da rede de interação - STRING**

Foi construída uma rede de interações entre os produtos gênicos através do programaString (<https://string-db.org/>). Nesta, os *clusters* de genes obtidos por meio

desta interação, representa as vias e processos que são compartilhados entre os genes diferencialmente expressos. O *String* consiste em cadeias de caracteres que armazenam dados de informações para as mais diversas finalidades. O conteúdo de uma *string* pode representar um fato em si, ou uma informação. A rede apresenta os genes como atributo. Os genes são representados pelos nodos, enquanto as linhas indicam as interações existentes entre eles. Extraímos interações com base em banco de dados, experimentos e co-expressão.

### **5.5. Análise de sensibilidade e especificidade dos genes diferencialmente expressos**

os DEGs comuns nos três bancos de dados foram avaliados quanto à sensibilidade e especificidade com base na intensidade de sinal de cada amostra através da ferramenta estatística SPSS 20.0. Foi realizada a análise da curva de Características Operacionais do Receptor (ROC, do inglês *Receiver Operational Characteristics Curve*). A área sob a curva (AUC, do inglês, *area under the curve*) de cada gene foi avaliada e, a partir desta avaliação, foram escolhidos os genes que apresentam AUC maior ou igual a 0.7 e valor de  $p < 0,05$ . Parâmetros para erro padrão da área, nível de confiança de 95%, é uma análise gráfica comparando os cinco genes que estão presentes nos três estudos.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. Identificação de genes diferencialmente expressos (GDE)**

A identificação dos GDE foi realizada nos três conjuntos de dados. Inicialmente, foram comparados os grupos saudáveis (CONTROLE) X SEPSE de cada conjunto de dados no GEO2R, seguida da análise destes dados no Excel, para verificar o valor de  $p$  e o Fold Change (FC). Depois da análise no excel foram utilizados 48 genes do estudo GSE12624, entre o grupo CONTROLE X SEPSE. No conjunto GSE131671, entre grupo CONTROLE X SEPSE, foram utilizados 132 genes. O terceiro conjunto GSE69063, entre os grupos CONTROLE X SEPSE, foram 485 genes diferencialmente expressos. Após análise, foram totalizados 665 GDE, todos eles utilizados neste estudo foram filtrados de acordo com o valor de  $p < 0,05$  e o FC  $-1,1$  e  $+ 1,1$ .



## 6.2. Enriquecimento de vias intracelulares dos dados GSE12624, GSE131761 E GSE69063

A partir da análise de enriquecimento de vias realizado pela plataforma online do *ENRICH*, foi possível identificar por meio de gráficos as vias intracelulares de sinalização que foram expressas e enriquecidas. A seguir estão discriminadas as vias intracelulares enriquecidas em comum entre os três conjuntos de dados que foi analisado em conjunto neste programa (GSE12624, GSE131761 e GSE69063), onde foi identificado as vias intracelulares dos processos biológicos, das funções moleculares, componentes celulares e expressão do KEGG que apresentaram expressão significativamente aumentada (Figura 4)

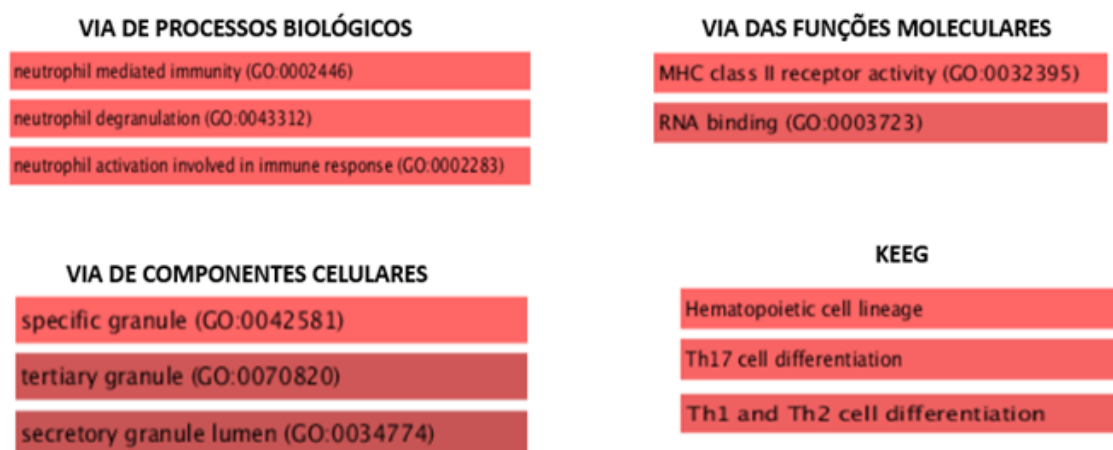


Figura 4. Análise de enriquecimento dos três conjuntos de dados GSE12324, GSE131761 e GSE69063 através da plataforma Enrichr. As vias estão ordenadas segundo o valor de p da classificação de enriquecimento.

## 6.3. Identificação dos GDE

No diagrama de venn comparamos os GDE contido nos três conjuntos de dados, e nele foi calculado as interseções presentes em cada estudo. A comparação entre os genes diferencialmente expressos que estão nos três estudos, o diagrama de Venn detectou interseções da lista de elementos dos três diferentes grupos, objetivando obter informações sobre os elementos expressos em comum nos três grupos. (Gráfico 1).

Foi possível observar por meio de gráfico e lista textual todos esses elementos, onde 5 destes apresentaram interseções nos três grupos. (Tabela 2)

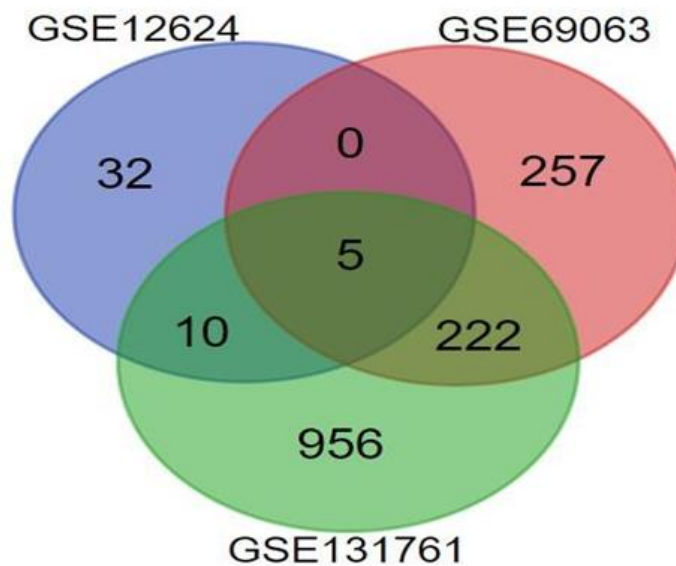


Gráfico 1: Representa a comparação dos três conjuntos de dados com a quantidade dos genes presentes em cada um deles e a interseção entre eles com os cinco genes presentes nos três estudos. Onde em azul está representado o conjunto de dados GSE12624 com 32 genes, apresentando 0 interseções com o grupo de GSE69063 (vermelho) e 10 interseções com o grupo de GSE131761(verde). Em vermelho está o GSE69063 apresentando 257 genes com 0 interseções com o grupo de GSE12624 (azul) e com GSE131761 em verde apresenta interseção de 222 genes. Em verde está o GSE131761 com 956 genes com 10 interseções com o GSE12624 (azul) e 222 interseções com o GSE69063 (vermelho) Foi observado 5 interseções em comum com os três grupos.

Os 5 genes encontrados que estão presentes nos três conjuntos de dados, foram analisados na plataforma *String*. Foi construída uma rede de interações entre os genes através do programa, como mostra na figura 5. A rede composta por 15 nós (proteínas) e 30 arestas (interações). calcula pontos mais centrais da rede e os genes com maior interação.

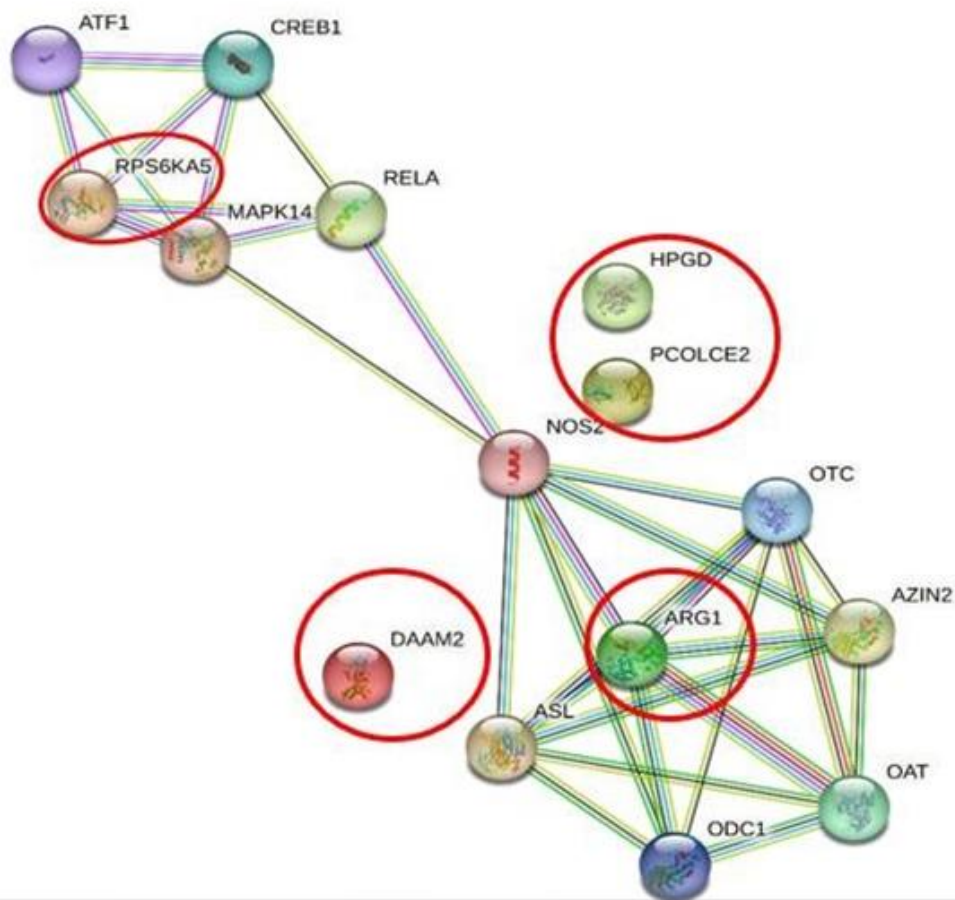


Figura 5: Rede de interação entre os genes diferencialmente expressos que estavam presentes nos três conjuntos de dados. As linhas liga os produtos gênicos entre si, os que estão circulado não tiveram interações com outras proteínas..

#### 6.4. Enriquecimento de vias intracelulares dos 5 GDE (ARG1, RPS6KA5, HPGD, DAAM2 e PCOLCE2)

Utilizamos novamente o *ENRICH*R para identificar as vias de intracelulares que os 5 GDE achados no diagrama de Venn. estão envolvidos

Análise de ontologia dos genes utilizando a Enciclopédia de Genes e Genoma de Kyoto (KEEG) identificou que as vias de maior significância estão envolvidas na biossíntese da arginina, no metabolismo de arginina e prolina e câncer de bexiga (gráfico 2).

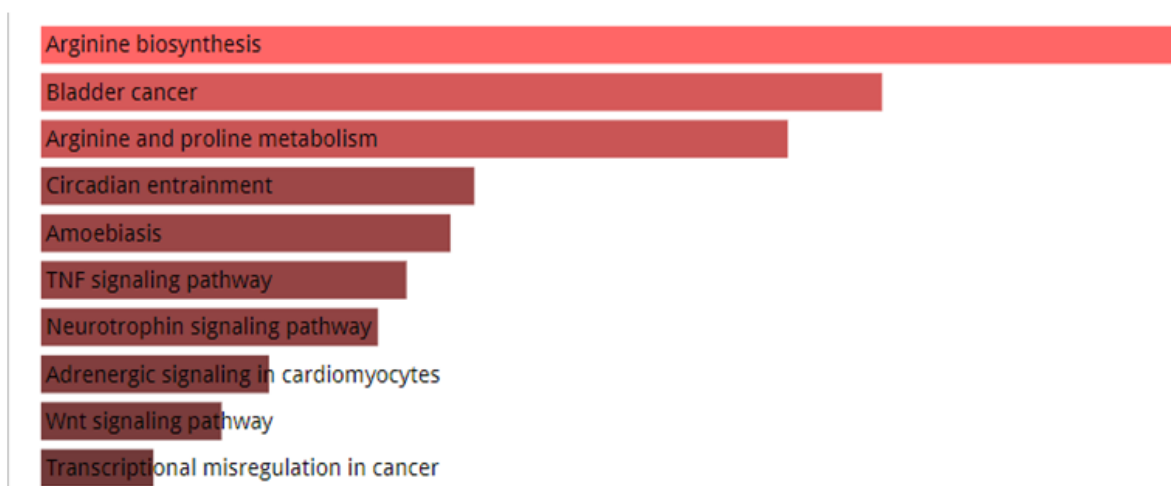


Gráfico 2 Análise de ontologia dos genes utilizando a Enciclopédia de Genes e Genoma de Kyoto (KEEG) dos 5 genes diferencialmente expressos, através da plataforma Enrichr. As vias estão ordenadas segundo o valor de p da classificação de enriquecimento. A barras com mais brilho são as mais significativas e o comprimento delas representa a significância do geneset.

A via dos processos biológicos, que os genes estão relacionados com maior significância foram a migração dos podócitos, a via da lipoxigenase, e os processos metabólicos da ornitina e arginina (Gráfico 3).

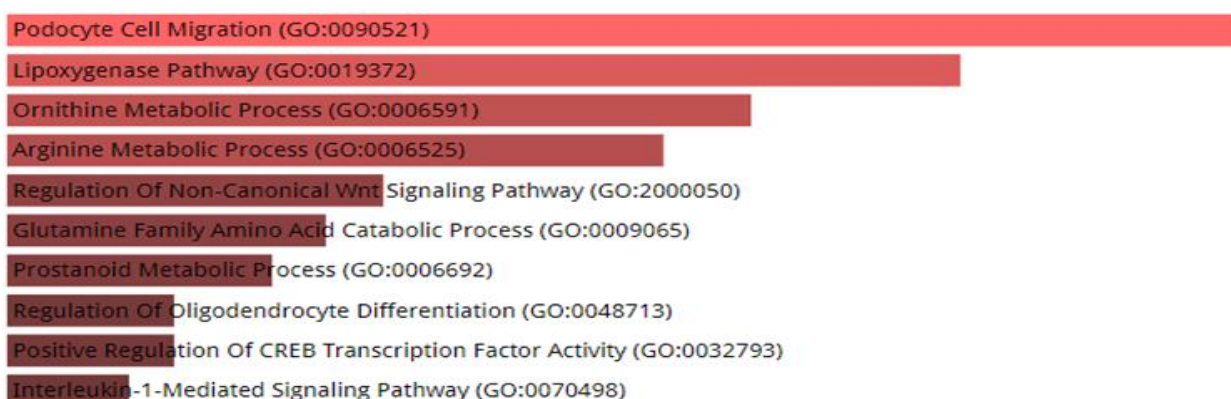


Gráfico 3: Análise de enriquecimento de vias intracelulares dos Processos biológicos que os 5 genes estão envolvidos, através da plataforma Enrichr. As vias estão ordenadas segundo o valor de p da classificação de enriquecimento. A barras com mais brilho são as mais significativas e o comprimento delas representa a significância do geneset.

Na via de função molecular, que os genes estão envolvidos, a atividade de histona H3 quinase, atividade de hidrolase, atuando no carbono-nitrogênio (mas não no peptídeo, promovendo a quebra do carbono e nitrogênio), a ligação NAD+, a atividade ativadora de peptidase, e a ligação de nucleotídeo, tiveram expressões significativas (Gráfico 4).

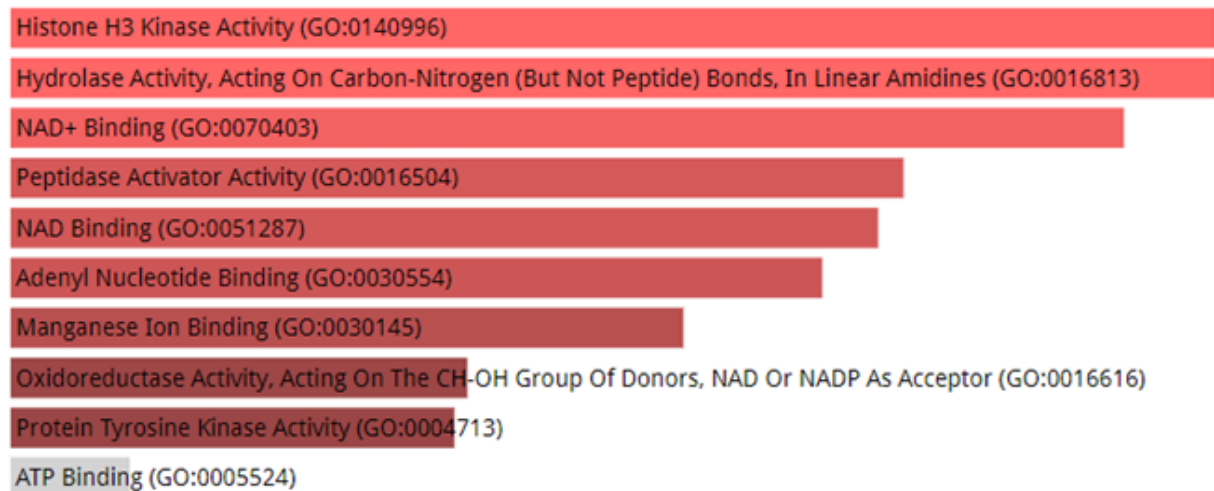


Gráfico 4: Análise de enriquecimento de vias intracelulares das funções moleculares que os 5 genes estão envolvidos, através da plataforma Enrichr. As vias estão ordenadas segundo o valor de p da classificação de enriquecimento. As barras com mais brilho são as mais significativas e o comprimento delas representa a significância do geneset.

As vias de componentes celulares que se mostraram mais significativas foram a lúmen específico do granulo, lúmen do granulo azúrofilo, granulo azúrofilo, granulo específico e lúmen vacuolar. (Gráfico 5)

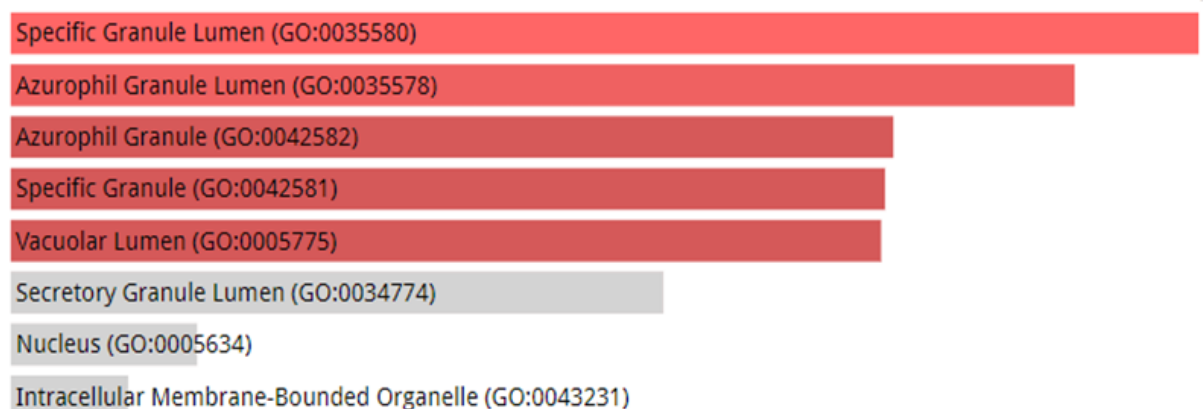


Gráfico 5: Análise de ontologia dos genes dos componentes celulares dos 5 genes diferencialmente expressos, através da plataforma Enrichr. As vias estão ordenadas segundo o valor de p da classificação de enriquecimento. As barras com mais brilho são as mais significativas e o comprimento delas representa a significância do geneset.

## 6.5. Análise de sensibilidade e especificidade

Foi feita uma análise de revisão sistemática com a ajuda do Excel com as amostras dos 5 GDE que foram utilizadas dos pacientes controle e com sepse, para identificar possíveis biomarcadores de diagnóstico precoce para a sepse, foi realizada uma análise da sensibilidade e especificidade de cada gene com base na intensidade de sinal normalizada de cada amostra com base na curva ROC, com

auxílio do software de análise estatística SPSS 20.0. Os valores obtidos foram selecionados aqueles que apresentavam área sob a curva (AUC) acima de 0,7 e p-valor <0,05 conforme apresentada na figura 5.

A tabela 3 apresenta os valores da área sob a curva, erro e desvio padrão e intervalo de confiança dos 5 genes que podem ser possíveis biomarcadores. Os 4 dos 5 genes previamente identificados pela análise de centralidade, apresentaram, boa especificidade e sensibilidade para identificar a sepse. Dentre eles, os genes ARG1, HPGD e PCOLCE2 apresentaram os melhores valores de sensibilidade e especificidade. (Tabela 3)

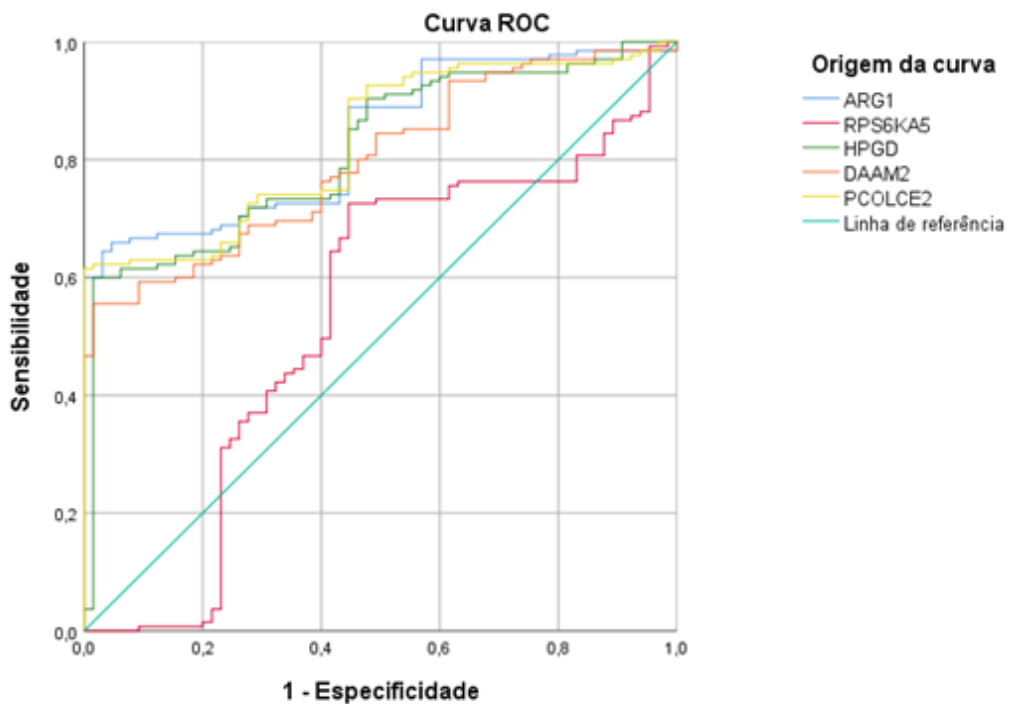


Gráfico 6. Curva ROC dos resultados segundo sua sensibilidade e taxa de falsos positivos. Os genes que apresentam a maior área sobre a curva são ARG1, HPGD, DAAM2 E PCOLCE2c om maiores sensibilidade e especificidade (maior proximidade do canto superior esquerdo do gráfico). A área sob a curva é, então, empregada como uma medida do desempenho do teste como discriminador de pacientes com sepse e os pacientes saudáveis.

### Área sob a curva

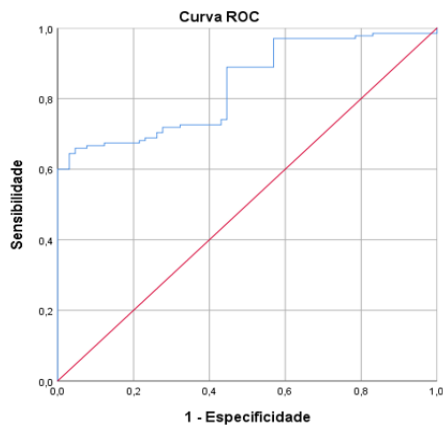
Variável(eis) de resultado de teste	Área	Erro Erro <sup>a</sup>	Sig. assintótico <sup>b</sup>	Intervalo de Confiança 95% Assintótico	
				Limite inferior	Limite superior
ARG1	,837	,027	,000	,783	,891
RPS6KA5	,535	,047	,429	,443	,626
HPGD	,815	,030	,000	,755	,874
DAAM2	,798	,030	,000	,738	,857
PCOLCE2	,831	,028	,000	,776	,886

a. Sob a suposição não paramétrica

b. Hipótese nula: área verdadeira = 0,5

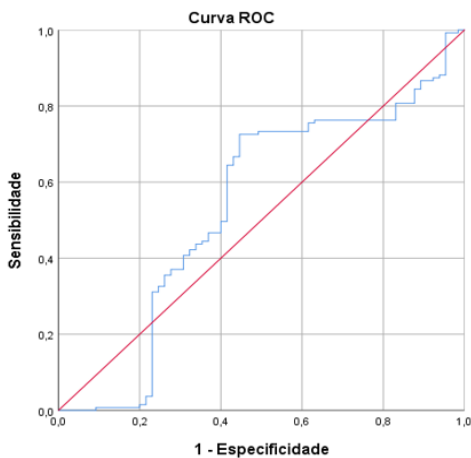
Tabela 1. Área sobre a curva de cada um dos genes, consideramos o valor maior que 0,7, então a variável que tem o maior valor preditor que tem 80% de chance de ser um biomarcador para sepse é ARG1, HPGD e PCOLCE2.

### 6.5.1. Valores de sensibilidade e especificidade dos 5 GDE isoladamente.



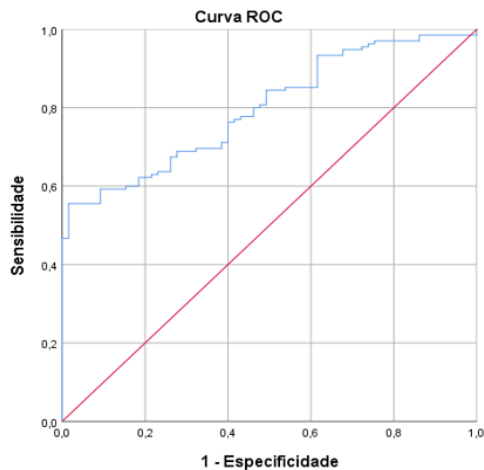
A) ARG1

AUC= 0,837  
EP= 0,027  
P<0,0  
95%CI=0,783-0,891



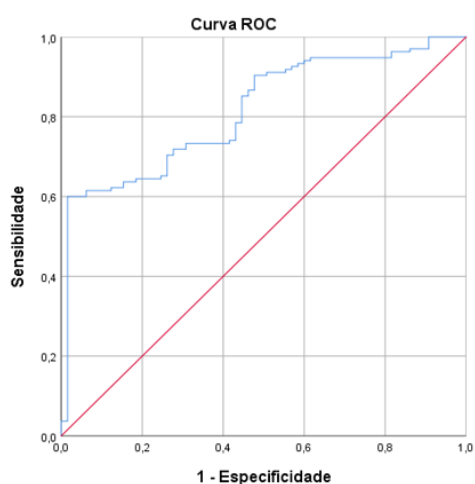
B) RPS6K5

AUC=0,535  
EP=0,047  
P=0,429  
95%CI=0,443-0,626



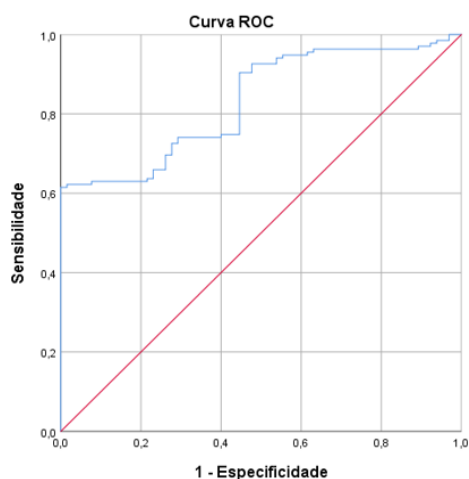
**C) HPGD**

AUC=0,815  
 EP=0,030  
 P=0,000  
 95%CI=0,755-  
 0.874



**D) DAAM2**

AUC=0,798  
 EP=0,030  
 P=0,000  
 95%CI=0,73  
 8-0,857



**E) PCOLCE2**

AUC=0,831  
 EP=0,028  
 P=0,000  
 95%CI=0,776  
 -0,886

**Gráfico 7- Análise de sensibilidade e 1- especificidade do conjunto de genes identificados pelo Diagrama de venn. As figuras A, C, D e E mostram a área sob a curva (AUC) dos genes que isoladamente apresentaram valores maiores que 0,7 e  $p < 0,05$ .**

## 6.6. Discussão

Até o presente momento não existe um biomarcador para diagnóstico precoce da sepse que seja específico e sensível. Por isso, a sepse continua sendo



uma patologia de elevada complexidade, agravada por diagnóstico impreciso e prognóstico obscuro em unidades de terapia intensiva de todo mundo. Portanto, a detecção precoce do quadro clínico da sepse com alta especificidade e sensibilidade é indispensável para a conduta terapêutica eficaz, realização de exames clínicos em diferentes estágios da sepse, monitoramento de estratificação dos pacientes e, por fim, redução nas taxas de mortalidade (BRACHT et al.,2019).

Os genes são apontados como importantes reguladores de processos biológicos, sendo potenciais candidatos a biomarcadores. Alguns genes estão envolvidos durante a sepse e podem ser ativados ou desativados, como consequência disso ocorre mudanças na expressão gênica (Fang-Chen., 2020). Baseado neste contexto, o presente estudo avaliou o perfil de expressão dos genes em três conjuntos de dados em indivíduos saudáveis (CONTROLE) e em sepse (SEPSE), bem como sua correlação com as vias intracelulares associadas ao desenvolvimento desta síndrome.

Foram utilizados três conjunto de dados de estudos distintos. O conjunto de dados GSE12624 disponibilizado por Thierer FJ (2012), cujos dados ainda não foram publicados, que podem contribuir para integrar com êxito os estudos de análise de expressão gênica em uma rotina clínica. Este estudo identificou mecanismos envolvidos nas alterações do sistema imunológico que levam à sepse. O conjunto de dados GSE131761, disponibilizado por Martinez-paz P (2019), refere-se à análise microarray realizada para comparar os perfis de expressão gênica no choque séptico e no choque não séptico, identificando os genes IGHG1, IL1R2, LCN2, LTF, MMP8 e OLFM4 como diferencialmente expressos. O conjunto de dados GSE69063, disponibilizado por Antonio Bosco (última atualização 2021), consistiu na análise de quatro fenótipos (anafilaxia, sepse, trauma e controle saudáveis) em três tempos diferentes, os controles saudáveis foram pareados com pacientes dentro de cada estudo. Estes estudos foram utilizados para avaliar a diferença do perfil de expressão dos genes em indivíduos saudáveis, e com sepse.

No presente estudo, foi realizada uma nova avaliação destes três conjuntos de dados a fim de gerar novos conhecimentos sobre genes e a possibilidade de novos programas e metodologias de análise em bioinformática. Desta forma, permitindo uma nova interpretação dos dados previamente obtidos e a proposição de um perfil baseado na influência dos genes no transcriptoma humano.

Os nomes dos genes foram identificados na plataforma Ensembl, utilizando os filtros e atributos de acordo com o ID de cada estudo. Após esta etapa de identificação, foi feito o enriquecimento de vias de cada um dos conjuntos de dados através da plataforma Enrichr. (Figura 4). Observou-se que nos três estudos, há semelhança nas vias dos processos biológicos, na função molecular e componentes celulares, isso comprova que a expressão genica dos indivíduos é consistente com a doença estudada, todos envolvidos em estados inflamatórios e infecciosos. As vias que mostram os processos biológicos estão relacionadas com a ativação de neutrófilos na resposta imune. Achado coerente com o quadro infeccioso, uma vez que estas são uma das primeiras células a chegar ao local da infecção, auxiliando na eliminação do patógeno (GODÍNEZ VIDAL et al.,2020).

Na via de componentes celulares destes estudos, a via de maior significância foi em relação aos grânulos específicos e terciários presentes em algumas células do sistema imune. Estes estão relacionados com a imunidade inata, o reconhecimento pelos TLRs plaquetários, principalmente de bactérias gram-negativas, exacerbando a reatividade das células devido ao aumento da quantidade destes grânulos e, conseqüentemente, auxiliando na eliminação destes patógenos (TAMELYTÉ et al., 2019).

As funções moleculares com maior significância foram relacionadas com a ativação dos receptores MHC classe II. Estes receptores estão presentes nas células apresentadoras de antígeno, ativam linfócito TCD4+envolvido na ativação de linfócitos B que iniciam respostas imunes humorais e ativam as células fagocitárias para eliminação de patógenos (AFRIDI et al.,2016).

A análise de vias pelo KEGG identificou quatro vias de sinalização significativamente enriquecidas. Essas vias de maior significância mostram que esses genes estão envolvidos com as linhagens de células hematopoiéticas, e com a diferenciação em Th1, Th2 e Th17. A resposta Th1 está associada com a liberação de citocinas pró-inflamatórias estimulando a morte intracelular dos patógenos. A resposta Th2 está envolvida na resolução da inflamação, liberando citocinas anti-inflamatórias, resultando em uma resposta mediada por linfócitos e na ativação de células B (XUE et al.,2019). A resposta Th17 está relacionada com a produção citocinas pró-inflamatórias, intensificando a resposta inflamatória (AIFA XIA et al.,2020).

Através da análise utilizando o diagrama de Venn, foram identificados 5 genes presentes nos três conjuntos de dados analisados, são eles: ARG1, RPS6K5, HPGD, DAAM2 e o PCOLCE2. Dois fatos apontam para que estes genes sejam potenciais biomarcadores: a associação com cascatas de eventos biológicos da sepse e a presença simultânea nos três conjuntos de dados analisados.

O gene ARG1 codifica a isoforma tipo I da enzima Arginase I, expressa predominantemente no citoplasma de células hepáticas, responsável pela conversão da L-arginina em ornitina e ureia. O metabolismo da arginina é um regulador crítico das respostas imunes inatas e adaptativas. A expressão do ARG1 pode ser induzida por interleucina-4 e ácido láctico (ARLAUKAS et al, 2018), compatível com quadro infeccioso. Corroborando com o resultado deste presente estudo, ZHANG e cols (2022) também apresentaram evidências de que a ARG1 pode atuar como um biomarcador para a sepse, uma vez que este gene que exerceu um papel primordial na interação proteína-proteína associado ao fenótipo clínico da sepse.

O gene RPS6K5, também encontrado nos três conjuntos de dados analisados, codifica a proteína cinase RPS6KA5 (Proteína Ribossomal S6 Quinase A5) ativada por mitógeno nuclear e estresse (MSK1). O MSK1 pode ser ativado por meio da fosforilação de seus resíduos de serina/treonina, permitindo sua translocação para o núcleo celular, onde desempenha papéis na regulação da expressão gênica (PRIVITERA L et al.,2020). Apontando para o potencial biomarcador apresentado por este gene envolvido na inflamação.

Outro achado relevante na investigação de um potencial biomarcador da sepse refere-se ao gene HPGD (15-Hidroxiprostaglandina Desidrogenase) que exerce função primordial inativação e no metabolismo das prostaglandinas, compostos bioativos resultante dos ácidos graxos essenciais. A enzima 15-hidroxiprostaglandina desidrogenase, codificada pelo gene HPGD, está envolvida na conversão da prostaglandina E2 (PGE2) em 15-ceto-PGE2, um metabólito inativo. Esse processo é importante para regular os níveis de prostaglandinas e manter o equilíbrio fisiológico, uma vez que a inativação das prostaglandinas é essencial para controlar a resposta inflamatória e a regulação de diversas vias biológicas. A enzima 15-hidroxiprostaglandina desidrogenase também está envolvida na degradação de outras prostaglandinas, como a prostaglandina D2 (PGD2) e a prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ). O HPGD atua em uma variedade de processos biológicos, como a

inflamação (QI LU et al.,2022) e, a exemplo dos genes anteriores, também apresenta potencial como biomarcador da sepse.

De acordo com a plataforma GeneCards, um banco de dados integrativo que fornece informações genômicas e amplamente utilizado pela comunidade científica, o gene DAAM2 (Ativador da morfogênese associado ao desalinhamento 2) codifica a proteína DAAM2, que desempenha um papel crucial na regulação da dinâmica do citoesqueleto de actina. Esta proteína está envolvida na ativação da ligação de actina e Gtpase, promovendo a polimerização e organização da actina. Este processo é importante para a formação e remodelação de estruturas celulares, como filopódios e lamelipódios, que são essenciais para a migração celular e a morfogênese.

Sob uma visão geral, o gene PCOLCE2 (Intensificador de C-endopeptidase de procolágeno 2) codifica proteínas relacionadas à cadeia do colágeno e a organização da matriz extracelular. Especificamente, a proteína PCOLCE2 codificada por este gene é conhecida como intensificador de C-endopeptidase de procolágeno 2. Desempenha um papel importante na ativação da enzima C-protease que cliva o procolágeno, formando o colágeno maduro, uma proteína essencial na estrutura e na conservação dos tecidos conjuntivos, como ossos, tendões, pele e vasos sanguíneos, também participa da atividade, ligação da heparina e ativadora de peptidase por mecanismo ainda não elucidado (Alliance of Genome Resources, acessado em abril de 2022).

A ferramenta STRING foi utilizada para analisar as interações entre os 5 genes encontrados no digrama de Venn. O sistema funcional desta ferramenta recolhe e insere informações de interações físicas e associações funcionais proteína-proteína (PPI) e constrói uma rede com base em todos os genes diferencialmente expressos (VON MERING et al.,2005). Não foram identificadas interações entre os genes DAAM2, HPGD e PCOLCE2 pelo STRING. Contudo, a análise referente ao gene ARG1 revelou a interação deste com outros 6 genes, OTC, NOS2, ASL, AZIN2, OAT e ODC1, que codificam proteínas que modulam diversos processos biológicos alterados no curso da sepse. A demonstração deste tipo de interação sugere fortemente a relevância da investigação de genes diferencialmente expressos como potenciais biomarcadores específicos e sensíveis na sepse.

Os genes OTC, NOS2, ASL e OAT codificam proteínas presentes no ciclo da ureia, mediando uma reação intermediária no ciclo da ureia que permite a desintoxicação do nitrogênio hepático. Este processo envolve a enzima ornitina transcarbamilase codificada pelo gene OTC, responsável por catalisar a reação entre a ornitina e o carbamoil-fosfato, resultando na formação da citrulina. Esta etapa do ciclo da ureia representa um importante processo metabólico que converte amônia em ureia para a sua eliminação do organismo. (LOPES, 2022). Genes envolvidos no ciclo da ureia têm importância inquestionável no quadro da sepse. Durante a sepse, a função hepática pode ser comprometida, levando a uma redução na capacidade do fígado de converter a amônia em ureia. Isso pode resultar em um acúmulo de amônia no organismo, conhecido como hiperamonemia. Esta complicação frequente na sepse pode contribuir para a disfunção orgânica associada ao quadro clínico da sepse. Portanto, o funcionamento adequado do ciclo da ureia e a eliminação eficiente da amônia desempenham um papel importante na resposta metabólica à sepse. A compreensão desses mecanismos pode ajudar na identificação e manejo da hiperamonemia, prevenindo suas consequências durante a sepse e melhorando o prognóstico. (CALDWELL et al., 2018).

O gene OAT funciona na homeostase da L-arginina em tecidos não hepáticos, processo caracterizado pela competição entre a óxido nítrico sintase (NOS) e a arginase pelo substrato intracelular disponível, a arginina. O metabolismo da arginina é um regulador crítico das respostas imunes inatas e adaptativas. Este gene está envolvido na via efetora antimicrobiana em granulócitos polimorfonucleares (PMN), na qual a escassez da arginina no microambiente leva à supressão da proliferação de células T e natural killer (NK) e a secreção de citocinas (SHEN S ET AL, 2021). A isoforma indutiva NOS-2 ou iNOS2 é produzida em quantidades maiores e expressa por macrófagos e outros tecidos em resposta a mediadores pró-inflamatórios, como lipopolissacarídeos de membrana bacteriana, endotoxinas e citocinas pró-inflamatórias (LUIKING et al., 2009).

O gene RPS6KA5 faz interações com MAPK14, RELA, CREB1 e ATF1. A MAPK14 é uma das quatro MAPKs p38 que desempenha função relevante na ativação direta de fatores de transcrição que participam de vias intracelulares que medeiam as respostas celulares a estímulos extracelulares, como citocinas pró-inflamatórias ou estresse físico. A RPS6KA5 estimula a transcrição de vários genes

pró-inflamatórios, como IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ , sendo associada à sepse pelas vias de sinalização MAPK e TNF (L DONG et al.,2019). A importância da MAPK14 foi demonstrada em modelo experimental quando foi demonstrado que a deficiência de MAPK14 em macrófagos protege camundongos da sepse induzida por lipopolissacarídeo (ZENG et al.,2021).

Após a criação da rede de interações no STRING, os 5 genes alvos diferencialmente expressos foram utilizados para enriquecimento de vias através da plataforma Enrichr, a fim de avaliar se essas vias estão implicadas na sinalização de sepse. As vias de sinalização da Enciclopédia de Genes e Genoma de Kyoto (KEEG) que tiveram maior significância estão envolvidas na biossíntese da arginina. Estudos demonstram que a arginina exerce uma função central no sistema imunológico, sendo o seu metabolismo especialmente importante para a ação de macrófagos e linfócitos T (STECHMILLER et al., 2004). Portanto, mais uma vez, os achados da análise in silico aqui apresentada apontam para potenciais biomarcadores da sepse. Especificamente no que se refere à arginina, apesar desta atender aos critérios de um aminoácido semi-essencial, isto é, a produção de arginina no nosso corpo cobre os requisitos metabólicos em indivíduos saudáveis, em casos de injúria e reparo tecidual e, inclusive, na sepse, a arginina se torna um aminoácido essencial (Köhler ES et. al., 2008). Na sepse, a arginina tem função importante na estabilidade da resposta imunológica, processos inflamatórios, síntese de colágeno na cicatrização de feridas e outras adaptações fisiopatológicas (CHIARLA et al., 2006; SUCKHOTNIK et al., 2005).

Corroborando com os resultados do presente estudo, há estudos que demonstraram que a deficiência de arginina e de citrulina pode ser a base da deterioração da função orgânica em condições inflamatórias desreguladas, como na sepse. Isto está relacionado às limitações na disponibilidade de arginina durante condições inflamatórias que afetam a ativação de macrófagos e linfócitos T (K. WIJNANDS et al.,2015).

Na análise de vias dos processos biológicos, observou-se que os genes relacionados com maior significância foram os da migração dos podócitos, células fundamentais que constituem a barreira de filtração glomerular, garantindo a permeabilidade seletiva. Especificamente, na sepse e no choque séptico, os podócitos, estão associados ao desenvolvimento da injúria renal aguda que é

caracterizada por perda da função renal, devido redução da filtração glomerular, e lesões de células glomerulares (LISOWSKA-MYJAK, 2010).

Outra via relacionada à sepse cuja expressão mostrou-se alterada é a da lipoxigenase. Esta via metabólica é responsável pela conversão de gordura poli-saturada em lipoxinas, leucotrienos, detectadas nas plaquetas e leucócitos circulantes. A lipoxigenase constitui um elemento chave envolvido no aumento da permeabilidade vascular e na ação vasodilatadora, promovendo a hipotensão, extravasamento de líquido, formação de edema tecidual, diminuição da resistência vascular sistêmica e a hipotensão, eventos característicos da sepse (BENNETT et al.,2016).

A HPGD é responsável pela conversão de prostaglandina E2 (PGE2) em seu metabólito inativo, 15-ceto-PGE2. Essa reação é importante para a regulação dos níveis de PGE2 no organismo e está envolvida na modulação da inflamação e da resposta imune (TAI HH et al., 2002). A degradação de prostaglandinas, que são mediadores lipídicos envolvidos em diversos processos fisiológicos, como a regulação da inflamação, a resposta imune, a homeostase cardiovascular, a regulação hormonal e a função renal. (KALINSKI, P. et al.2012)

Na via de função molecular, a que se mostrou significativamente alterada foi a da atividade da histona H3 cinase que está relacionada com o gene RPS6KA5, favorecendo à atividade da proteína serina/treonina cinase. Proteína que participa de processos, como a fosforilação histona-serina; estruturação positiva da conversão de histonas. A fosforilação da histona H3 em resíduos específicos, como a serina 10 (S10) e a serina 28 (S28), está associada a processos regulatórios da cromatina. A fosforilação do H3S10, por exemplo, é frequentemente associada à ativação de genes. Ela pode facilitar a abertura da cromatina e permitir o acesso de fatores de transcrição aos sítios de ligação no DNA, promovendo assim a expressão gênica. (BOTIA B et al.,2012).

Outra via que está envolvida na função molecular é a ligação NAD<sup>+</sup> participa do metabolismo energético, que realizam a clivagem de ligações peptídicas de outras proteínas, está envolvido com o gene HPGD, a enzima codificada pôr a HPGD, é responsável por catalisar a desidrogenação (oxidação) dependente de NAD de uma variedade extensa de ácidos graxos poliinsaturados hidroxilados, como eicosanóides, docosanóides, prostaglandinas, lipoxinas e resolvinas. Essa reação

resulta na formação dos metabólitos ceto (oxo) correspondentes a esses ácidos graxos. Reduz os níveis de prostaglandinas pró-proliferativas, incluindo a prostaglandina E2. Além disso, gera produtos de ácidos oxo-graxos que têm a capacidade de exercer uma profunda influência na função celular, inibindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias (STABLES MJ.,2011).

O gene diferencialmente expresso PCOLCE2 está ligado via de ativação de peptidase, relacionando-se à regulação positiva da atividade da peptidase. As peptidases desempenham um papel crucial na regulação de processos biológicos. Na inflamação, as peptidases estão envolvidas em várias etapas do processo inflamatório, incluindo a resposta imune e a imunidade tecidual. A ativação de peptidases durante a inflamação é um mecanismo importante para controlar a resposta inflamatória, eliminar patógenos e iniciar o processo de cicatrização de tecidos danificados. No entanto, quando há uma disfunção nessa regulação, podem surgir doenças inflamatórias crônicas e outras condições inflamatórias patológicas. Por isso, o equilíbrio adequado das peptidases é essencial para a manutenção da homeostase e da resposta imune eficiente. Existem diferentes tipos de peptidases envolvidas na inflamação, na regulação da apoptose, liberação de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de células imunes para o local da inflamação (STEIGLITZ et al.,2002).

Com base nos 5 genes encontrados neste estudo as vias que se mostraram mais significativas nos componentes celulares foram as vias do lúmen específico do granulo, lúmen do granulo azúrofilo, granulo azúrofilo, granulo específico e lúmen vacuolar. Essas vias estão envolvidas com o gene ARG1. A proteína ARG1 é liberada pelos granulócitos humanos, que durante o processo inflamatório, retém uma grande ação no espaço extracelular, além de desempenhar um grande efeito imunossupressor na imunidade. Desempenha um papel fundamental na regulação do metabolismo podendo influenciar na produção de óxido nítrico, que está envolvido na resposta imunológica e na função dos vasos sanguíneos. A supressão dos linfócitos T através ARG1, pode contribuir para um mau prognóstico e morte de pacientes sépticos. (VENET F et al.,2018).

Os grânulos azurofílicos, estão presentes nas estruturas de algumas células imunes, como os neutrófilos e eosinófilos, e são importantes para as respostas imunes do corpo, pois contêm várias substâncias bioquímicas, como como enzimas



lisossômicas, mieloperoxidase (MPO), enzimas proteolíticas (catepsinas, proteinase-3 e elastase) e defensinas. (PHAM, 2006). Somando a maioria dos leucócitos presentes na corrente sanguínea, os neutrófilos são células polimorfonucleares e especializadas no combate a infecções através da fagocitose do patógeno e liberação de seus conteúdos granulares. A presença de ARG1 em alguns grânulos azurofílicos sugere que ela é liberada durante a ativação dos leucócitos e pode desempenhar um papel na resposta imunológica dessas células (DA-SILVA ET AL.,2019).

A curva ROC foi utilizada para identificar potenciais biomarcadores para sepse, a partir de dados dos 5 genes diferencialmente expressos derivados dos grupos controles saudáveis e pacientes com sepse que constituem os conjuntos de dados GSE12624, GSE131761 e GSE69063. A análise da curva ROC demonstrou que os 5 genes apresentaram boa sensibilidade e especificidade para diagnóstico de sepse, sendo que, os genes ARG1, HPGD, DAAM2 e PCOLCE2, apresentaram melhor área sob a curva maior que 0.7 e valor de  $p < 0,05$ . Com intervalo de confiança de 95% podendo servir como biomarcadores de diagnósticos para a sepse. Já o gene RPS6KA5 apresentou uma baixa sensibilidade e especificidade, com a área sob a curva menor 0.7.

## **7. CONCLUSÃO**

Através da análise de bioinformática dos conjuntos de dados previamente disponibilizado publicamente, é possível sugerir que alterações no perfil de genes de pacientes com sepse levam ao comprometimento de vias envolvidas na modulação da inflamação e da resposta imune. Os 5 genes identificados pela análise de centralidade 4 (ARG1, HPGD, DAAM2 e PCOLCE2) apresentaram boa especificidade e sensibilidade para diagnóstico precoce e prognóstico da sepse, e apresentam correlação com a patogênese da sepse. Estes resultados sugerem o papel destes 4 genes como biomarcadores na sepse, contribuindo para a construção de um perfil de assinatura no diagnóstico precoce da doença. A identificação e validação destes biomarcadores in vivo contribuirá também para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ACKERMAN, M. H. et. al. Sepsis. **Crit Care Nurs Clin North Am**, [s. l.], v. 33, ed. 4, p. 407-418, 2021.

AFRIDI, S. *et al.* Mechanistic understanding and significance of small peptides interaction with MHC class II molecules for therapeutic applications. **Immunol Rev**, [s. l.], v. 272, n. 1, p. 151-68, 2016.

K. ABBAS, Abul; H. LICHTMAN, Andrew; PILLAI, Shiv. **Cellular and Molecular Immunology**. 10ª edição. ed. [S. l.]: GEN Guanabara Koogan, 2023. 632 p.

BANNENBERG, Gerhard *et al.* Endogenous receptor agonists: resolving inflammation. **O Jornal do Mundo Científico**, [s. l.], v. 7, 2007.

BELTRAN, W. A. *et al.* CREB1/ATF1 Activation in Photoreceptor Degeneration and Protection. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, [s. l.], v. 50, n. 11, p. 5355-63, 2009.

BENNETT, M.; GILROY, D. W. Lipid Mediators in Inflammation. **Microbiol Spectr**, [s. l.], v. 4, n. 6, 2016.

BERG, D.; GERLACH, H. Recent advances in understanding and managing sepsis. **F1000Res**, [s. l.], v. 28, ed. 7, p. 1570, 2018.

BLOOS, Frank et al. Rapid diagnosis of sepsis. *Virulence*, [s. l.], v. 5, ed. 1, 2013.

BONE, R. C. The pathogenesis of sepsis. **Ann Intern Med**, [s. l.], v. 115, ed. 6, p. 457-69, 1991.

BOTIA, B. *et al.* Expression of Ethanol-Induced Behavioral Sensitization Is Associated with Alteration of Chromatin Remodeling in Mice. **PLoS One**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 52, 2012.

BRACHT, Hendrik. *et al.* [Sepsis Update: Definition and Epidemiology]. **Anesthesiol**

**Intensivmed Notfallmed Schmerzther**, [s. l.], v. 54, ed. 1, p. 10-20, 2019.

BRONTE, V. *et al.* L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. **Trends Immunol**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 302-306, 2003.

BUTRIN, A. *et al.* Determination of the pH dependence, substrate specificity, and turnovers of alternative substrates for human ornithine aminotransferase. **J Biol Chem**, [s. l.], v. 298, n. 6, 2022.

CALDWELL, R. W. *et al.* Arginase: A Multifaceted Enzyme Important in Health and Disease. **Physiol Rev**, [s. l.], v. 98, n. 2, p. 641-655, 2018.

CANDEL, F. J. *et al.* Current aspects in sepsis approach. Turning things around. **Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther**, [s. l.], v. 31, ed. 4, p. 298-315, 2018.

CECCONI, M. *et al.* Sepsis and septic shock. **Lancet**, [s. l.], v. 392, ed. 10141, p. 75-87, 2018.

CHIARLA, C. *et al.* Plasma arginine correlations in trauma and sepsis. **Amino Acids**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 81-6, 2006.

CHIU, C. *et al.* Epidemiology of sepsis and septic shock. **Curr Opin Anaesthesiol**, [s. l.], v. 34, ed. 2, p. 71-76, 2021.

CIANCIARULLO, M. A. *et al.* Mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios na sepse neonatal: associação entre homeostase e evolução clínica. **Journal of Human Growth and Development**, São Paulo, v. 18, n. 2, 2008.

CILIA, R. **Níveis de Interleucina-8 e Fator de Necrose Tumoral Alfa em pacientes pediátricos com sepse e choque séptico**. Orientador: José Roberto Fioretto. 2018. 57 p. Dissertação (Mestrado) - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO", Botucatu, 2018.

CUI, Shunan *et al.* Screening of potential key ferroptosis-related genes in sepsis. **BIOINFORMATICS AND GENOMICS**, [s. l.], 2022.

DENNING, N. *et al.* DAMPs and NETs in Sepsis. **Front Immunol**, [s. l.], v. 10, p. 2536, 2019.

DO NASCIMENTO, F. L. F. *et al.* The anti-inflammatory effect of Andira anthelmia lectin in rats involves inhibition of the prostanoid pathway, TNF- $\alpha$  and lectin domain. **Mol Biol Rep**, [s. l.], v. 49, n. 9, p. 8847-8857, 2022.

DOGANYIGIT, Zuleyha *et al.* Inflammatory mediators of cytokines and chemokines in sepsis: From bench to bedside. **Sage journals**, [s. l.], v. 41, 2022.

ESPOSITO, S. *et al.* Sepsis and septic shock: New definitions, new diagnostic and therapeutic approaches. **J Glob Antimicrob Resist**, [s. l.], v. 10, p. 204-212, 2017.

E RUDD, Kristina *et al.* Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **ELSEVIER**, [s. l.], v. 395, ed. 10219, 2020.

FERRAZ, E. G. *et al.* Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. **RGO.Revista Gaúcha de Odontologia**: características, barreiras e práticas exitosas, Porto Alegre, v. 59, n. 3, 2011.

GLOBAL report on the epidemiology and burden of sepsis. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240010789>. Acesso em: 7 jun. 2023.

GUIRGIS, F. *et al.* Points & Pearls: Updates and controversies in the early management of sepsis and septic shock. **Emerg Med Pract**, [s. l.], v. 20, ed. Suppl10, p. 1-2, 2018.

HE, J. *et al.* Progesterone and allopregnanolone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury. **Exp Neurol**, [s. l.], v. 189, ed. 2, p. 404-12, 2004.

HEUNG, Michael *et al.* Entanglement of Sepsis, Chronic Kidney Disease, and Other Comorbidities in Patients Who Develop Acute Kidney Injury. **ELSEVIER**, [s. l.], v. 35,

ed. 1, 2015.

HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. **N Engl J Med**, [s. l.], v. 348, n. 2, p. 138-50, 2003.

HUANG, M. *et al.* The Pathogenesis of Sepsis and Potential Therapeutic Targets. **Int J Mol Sci**, [s. l.], v. 20, n. 21, p. 5376, 2019.

HUERTA, L. E.; RICE, T. W. Pathologic Difference between Sepsis and Bloodstream Infections. **J Appl Lab Med**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 654-663, 2019.

ILAS - Instituto Latino-Americano de Sepse: "Implementação de protocolo gerenciado de sepse protocolo clínico". [S. l.], 2018. Disponível em: <https://ilas.org.br/asseter/arquivos/ferramentas/protocolo-de%20tratamento.pdf>. Acesso em: 4 maio 2023.

IVETIC, A. *et al.* L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling. *Front Immunol*, [s. l.], v. 10, p. 1068, 2019.

IBA, Toshiaki *et al.* Roles of Coagulation Abnormalities and Microthrombosis in Sepsis: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. **ELSEVIER**, [s. l.], v. 52, ed. 8, 2021.

JACOBI, J. The pathophysiology of sepsis - 2021 update: Part 2, organ dysfunction and assessment. **Am J Health Syst Pharm**, [s. l.], v. 79, n. 6, p. 424-436, 2022.

JIANG, F. *et al.* ODC1 inhibits the inflammatory response and ROS-induced apoptosis in macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, [s. l.], v. 504, n. 4, p. 734-741, 2018.

J DENSTAEDT, Scott *et al.* Blood count derangements after sepsis and association with post-hospital outcomes. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 14, 2023.

KALINSKI, P. *et al.* Regulation of immune responses by prostaglandin E2. **J**

**Immunol**, [s. l.], v. 188, n. 1, p. 21-28, 2012.

KÖHLER, E. S. *et al.* The human neonatal small intestine has the potential for arginine synthesis; developmental changes in the expression of arginine-synthesizing and -catabolizing enzymes. **BMC Dev Biol**, [s. l.], v. 8, p. 107, 2008.

LAWSON, Charlotte *et al.* ICAM-1 signaling in endothelial cells. **ELSEVIER**, [s. l.], v. 61, ed. 1, 2009.

LEE, Hyunbeom *et al.* Ornithine aminotransferase versus GABA aminotransferase: implications for the design of new anticancer drugs. **Med Res Rev**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 286-305, 2015.

LEE, Y. *et al.* L-Arginine and L-Citrulline Supplementation Have Different Programming Effect on Regulatory T-Cells Function of Infantile Rats. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 9, 2018

LINS, A. N. S. *et al.* Perfil epidemiológico das internações por sepse no Brasil entre 2017 e 2021. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 11, n. 11, 2022.

LISOWSKA-MYJAK, B. *et al.* Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury. **Blood Purif**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 357-65, 2010.

LIU, Z. *et al.* Prognostic accuracy of the serum lactate level, the SOFA score and the qSOFA score for mortality among adults with Sepsis. **Scand J Trauma Resusc Emerg Med**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 51, 2019.

LOPES, F. F. **Avaliação in vivo do dano oxidativo a biomoléculas e da inflamação em pacientes portadores de Doenças do Ciclo da Ureia : aspectos clínicos e bioquímicos na hiperamonemia.** 2022. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2022.

LÓPEZ-CONTRERAS, A. J. *et al.* Antizyme inhibitor 2: molecular, cellular and physiological aspects. **Amino Acids**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 603-11, 2010.

LU, X. *et al.* Negative regulation of RelA phosphorylation: emerging players and their roles in cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 7-13, 2015.

MARTÍNEZ-PAZ, Pedro *et al.* Distinguishing septic shock from non-septic shock in postsurgical patients using gene expression. **ELSEVIER**, [s. l.], v. 83, ed. 2, 2021.

MERCHANT, N. *et al.* 5-Lipoxygenase: Its involvement in gastrointestinal malignancies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, [s. l.], v. 127, p. 50-55, 2018.

MING, T. *et al.* Integrated Analysis of Gene Co-Expression Network and Prediction Model Indicates Immune-Related Roles of the Identified Biomarkers in Sepsis and Sepsis-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome. **Front Immunol**, [s. l.], v. 13, p. 1-15, 2022.

MORIYAMA, K.; NISHIDA, O. Targeting Cytokines, Pathogen-Associated Molecular Patterns, and Damage-Associated Molecular Patterns in Sepsis via Blood Purification. **Int J Mol Sci**, [s. l.], v. 22, n. 16, p. 8882, 2021.

MUNDER, M. *et al.* Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. **Blood**, [s. l.], v. 108, n. 5, p. 1627-34, 2006.

NEDEVA, Christina *et al.* Sepsis: Inflammation Is a Necessary Evil. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 7, ed. 108, 2019.

KIBE, Savitri *et al.* Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. **J Antimicrob Chemother**, [s. l.], p. 33-40, 2011.

PARLATO, M. *et al.* Circulating biomarkers may be unable to detect infection at the early phase of sepsis in ICU patients: the CAPTAIN prospective multicenter cohort study. **Medicina Intensiva**, [s. l.], v. 44, ed. 7, 2018.

PERNER, A. *et al.* Sepsis: frontiers in diagnosis, resuscitation and antibiotic therapy. **Intensive Care Med**, [s. l.], v. 42, n. 12, p. 1958-1969, 2016.

PEREZ-VILLA, F *et al.* Elevated levels of serum interleukin-6 are associated with low grade cellular rejection in patients with heart transplantation. **ELSEVIER**, [s. l.], v. 38, ed. 9, 2006.

PIERRAKOS, C. *et al.* Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. **Crit Care**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 287, 2020.

PÓVOA, P *et al.* C-reactive protein as a marker of infection in critically ill patients. **ELSEVIER**, [s. l.], v. 11, ed. 2, 2005.

PRESCOTT, H. C.; ANGUS, D. C. Enhancing Recovery From Sepsis: A Review. **JAMA**, [s. l.], v. 319, n. 1, p. 62-75, 2018.

QI, Xinxin *et al.* Identification and characterization of neutrophil heterogeneity in sepsis. **Critical Care**, [s. l.], v. 25, ed. 1, 2023.

RAJAEI, A. *et al.* Pathogen- and Danger-Associated Molecular Patterns and the Cytokine Response in Sepsis. **Surg Infect (Larchmt)**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 107-116, 2018.

REYES, M. *et al.* An immune-cell signature of bacterial sepsis. **Nat Med**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 333-340, 2020.

RIBEIRO, D. D. M. *et al.* Lactato como marcador prognóstico de um paciente em sepse: Relato de caso. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão.**, [s. l.], v. 12, n. 2, 2020.

RUSSEL, C. *et al.* Development of a needle shaped microelectrode for electrochemical detection of the sepsis biomarker interleukin-6 (IL-6) in real time. **Biosens Bioelectron**, [s. l.], v. 126, p. 806-814, 2019.

SABINO, A. *et al.* Detecção de podocitúria em pacientes com nefrite lúpica. **Brazilian Journal of Nephrology** , [s. l.], v. 35, n. 4, 2013.



SALES JUNIOR, J. A. L. *et al.* Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepse em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [s. l.], v. 18, n. 1, 2006.

SALOMÃO, R. *et al.* Sepsis: evolving concepts and challenges. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 52, n. 4, 2019.

SHEN, S. *et al.* Turnover and Inactivation Mechanisms for (S)-3-Amino-4,4-difluorocyclopent-1-enecarboxylic Acid, a Selective Mechanism-Based Inactivator of Human Ornithine Aminotransferase. **J Am Chem Soc**, [s. l.], v. 143, n. 23, p. 8689-8703, 2021.

SILBINGER, V. N. *et al.* Novel genes detected by transcriptional profiling from whole-blood cells in patients with early onset of acute coronary syndrome. **Clin Chim Acta**, [s. l.], v. 421, p. 184-90, 2013.

Silva, R. R., Oliveira, T. T., Nagem T. J., Leão, M.A. Efeito de flavonóides no metabolismo do ácido araquidônico. *Medicina, Ribeirão Preto*, v. 35, n.2 p.127-33, 2022.

SIMS, C. R. *et al.* Sims CR, Nguyen TC & Mayeux PR. Could Biomarkers Direct Therapy for the Septic Patient? *J Pharmacol Exp Ther*, 2016; 357:228–239. **J Pharmacol Exp Ther.**, [s. l.], v. 357, n. 2, p. 228-239, 2016.

SINGER, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, [s. l.], v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.

SIQUEIRA-BATISTA, R. *et al.* Sepsis: atualidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [s. l.], v. 23, n. 2, 2011.

STABLES, M. J. *et al.* Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. **Prog Lipid Res**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 35-51, 2011.

STANSKI, N. L. *et al.* Prognostic and predictive enrichment in sepsis. **Nat Rev Nephrol**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 20-31, 2020.

STEIGLITZ, B. M. *et al.* PCOLCE2 encodes a functional procollagen C-proteinase enhancer (PCPE2) that is a collagen-binding protein differing in distribution of expression and post-translational modification from the previously described PCPE1. **J Biol Chem**, [s. l.], v. 277, n. 51, p. 49820-30, 2002.

STELZER, G. *et al.* The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. **Curr Protoc Bioinformatics**, [s. l.], v. 54, 2016.

SURVIVING Sepsis Campaign - bundles of care. Society of Critical Care. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.sccm.org/SurvivingSepsisCampaign/Home>. Acesso em: 19 maio 2023.

TAMELYTĚ, E. *et al.* Early Blood Biomarkers to Improve Sepsis/Bacteremia Diagnostics in Pediatric Emergency Settings. **Medicina (Kaunas)**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 99, 2019.

ULLOA, Luis; TRACEY, Kevin J. The "cytokine profile": a code for sepsis. *Trends Mol Med*, [s. l.], n. 2, ed. 11, p. 56-63, 2005.

VAN DER POLL, T *et al.* The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. **Nat Rev Immunol**, [s. l.], v. 17, n. 7, p. 407-420, 2017.

VENET, F.; MONNERET, G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. **Nat Rev Nephrol**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 121-37, 2018.

VON MERING, C. *et al.* STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. **Nucleic Acids Res**, [s. l.], v. 33, 2005.

WIERSINGA, W. J. *et al.* Host innate immune responses to sepsis. **Virulence**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 36-44, 2014.

WIERSMA, M. *et al.* Protein kinase Msk1 physically and functionally interacts with the KMT2A/MLL1 methyltransferase complex and contributes to the regulation of

multiple target genes. **Epigenetics Chromatin**, [s. l.], v. 9, p. 52, 2016.

WIJNANDS, K. A. P. *et al.* Citrulline a More Suitable Substrate than Arginine to Restore NO Production and the Microcirculation during Endotoxemia. **PLoS One**, [s. l.], v. 7, n. 5, 2012.

XIA, H. *et al.* Maresin1 ameliorates acute lung injury induced by sepsis through regulating Th17/Treg balance. **Life Sci**, [s. l.], v. 254, 2020.

XUE, M. *et al.* Early and dynamic alterations of Th2/Th1 in previously immunocompetent patients with community-acquired severe sepsis: a prospective observational study. **J Transl Med**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 57, 2019.

ZENG, X. *et al.* Screening of Key Genes of Sepsis and Septic Shock Using Bioinformatics Analysis. **J Inflamm Res**, [s. l.], v. 14, p. 829-841, 2021.

ZHANG, J. *et al.* ARG1 as a promising biomarker for sepsis diagnosis and prognosis: evidence from WGCNA and PPI network. **Hereditas**, [s. l.], v. 159, n. 1, p. 27, 2022.

ZHANG, Y.; NING, B. Signaling pathways and intervention therapies in sepsis. **Signal Transduct Target Ther**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 407, 2021.

ZHANG, Z. *et al.* Deep learning-based clustering robustly identified two classes of sepsis with both prognostic and predictive values. **EBioMedicine**, [s. l.], v. 62, 2020.

ZHANG, Z. *et al.* Gene correlation network analysis to identify regulatory factors in sepsis. **J Transl Med**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 381, 2020.

