

FERNANDA ANDRADE MACAFERRI DA FONSECA NUNES

**Estudo da expressão de genes envolvidos na via do NF- κ B na
sepsis neonatal tardia: valor potencial no diagnóstico e
prognóstico**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção de
título de Mestre em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Dra. Patricia Palmeira Daenekas Jorge

São Paulo

2021

FERNANDA ANDRADE MACAFERRI DA FONSECA NUNES

**Estudo da expressão de genes envolvidos na via do NF- κ B na
sepsis neonatal tardia: valor potencial no diagnóstico e
prognóstico**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção de
título de Mestre em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Dra. Patricia Palmeira Daenekas Jorge

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nunes, Fernanda Andrade Macaferri da Fonseca

Estudo da expressão de genes envolvidos na via do NF- κ B na sepse neonatal tardia : valor potencial no diagnóstico e prognóstico / Fernanda Andrade Macaferri da Fonseca Nunes. -- São Paulo, 2021.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.

Orientador: Patricia Palmeira Daenekas Jorge.

Descritores: 1. Sepse neonatal 2. Expressão gênica 3. Citocinas 4. Lectina de ligação a manose 5. Metaloproteinase 9 da matriz 6. Receptor gatilho 1 expresso em células mielóides

USP/FM/DBD-158/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

A minha querida família

Dedico esta dissertação aos meus pais Rogério e Iraci que, com amor, carinho e trabalho, construíram o lar onde nasci e formei a minha personalidade. Quero dedicar com imenso reconhecimento este trabalho, sabendo que isso só foi possível porque todas as virtudes me foram ensinadas e praticadas. A vocês devo tudo! A minha irmã Patricia (minha nenê) que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Ao meu esposo Leandro por todo amor verdadeiro, respeito e companheirismo ao longo desses anos. A minha pequena Karina, meu presente de Deus, que me fez descobrir o lado mais doce da vida. Sinto um amor imenso por vocês, obrigada por sempre me apoiarem e estarem presentes na minha vida. Amo vocês com todo meu coração.

Agradecimento especial,

A minha querida orientadora Dra. Patricia Palmeira, por depositar sua confiança no meu trabalho, não há palavras que possam expressar minha emocionada gratidão, obrigada pela oportunidade de aprender com você, pelas valiosas e incontáveis horas dedicadas ao projeto e por toda sua amizade. Você foi constante fonte de incentivo ao longo desse período e é a minha inspiração.

Agradecimentos

Ao senhor pai divino, meu Deus, primeiramente por sempre ter me iluminado e estar permanentemente dentro de mim, me dando forças para seguir o meu caminho;

À Dra. Andreia Rangel Santos, minha eterna gratidão por toda sua amizade, atenção e cuidado na realização dos experimentos. Você foi fundamental na realização desse trabalho, obrigada por todo auxílio e apoio em todos os momentos requisitados e pelo exemplo de profissionalismo;

À minha amiga Ying, por tudo o que fez durante o projeto, por cada experimento e referência corrigida... obrigada por sua amizade, pelos momentos de convívio dentro e fora do laboratório, e que venha mais almoços no “bandeijão” e conversas sobre bebês e cabelos rs;

À minha querida amiga Marília pelo auxílio nas correções, por nos socorrer nos momentos de dúvidas, nos envios de referências e todas as discussões sobre o tema. Obrigada por toda sua amizade, obrigada por todos os momentos que tivemos juntas, naqueles que rimos, no que choramos, que ficamos empolgadas comprando e dividindo shampoos e máscaras, que nos emocionamos, nos que torcemos uma pela outra, quantos momentos tivemos, histórias e mais histórias para contar! Vc está no meu coração, obrigada!;

À Gisele e ao Vandeclecio da empresa DUNA bioinformatics por todo trabalho feito nas análises e pela paciência e comprometimento em prontamente atender todas as minhas dúvidas. Obrigada por tudo;

À Profa. Dra. Magda M. S. Carneiro-Sampaio e ao Prof. Dr. Carlos Alberto Moreira Filho por ter disponibilizado o laboratório permitindo, assim, a realização deste trabalho;

Aos membros da Banca examinadora do Exame de Qualificação: profa. Dra. Cléa Rodrigues Leone, Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro e Dra. Débora Romeo Bertolla;

Ao Leandro Ferreira, técnico de laboratório e colega do LIM 36 da FMUSP, por ter me auxiliado a qualificar todas as minhas amostras, minha gratidão por toda sua disponibilidade em me auxiliar e por todas as risadas nos momentos de descontração entre os experimentos;

Aos queridos amigos e companheiros de aprendizado, desde o início em 2007 no LIM 36- ICrHCFMUSP, quando nem eu imaginava que poderia chegar tão longe, Dra. Patricia Pieri, serei sempre grata pela oportunidade, Rô obrigada por tudo, Kerol e Vagner que saudade, quantos momentos maravilhosos passamos juntos. As minhas amigas queridas Ana Lúcia, Jerusa, Regina, Laila, Simone, Bernadete, Silvia, Fernanda, a todos os estagiários e todos aqueles que passaram pelo laboratório e na minha vida que me auxiliaram muito, não só pelo trabalho, mas acima de tudo pelo carinho e amizade. Vocês foram fundamentais em todas as horas, obrigada de coração por tudo;

À Dra. Estela NovaK e suas alunas Thamiris, Alana e Vanessa por todo auxílio, empréstimo de reagentes e momentos de convivência no laboratório;

Aos meus avós, João, Ivone, Thomaz (in memoriam) e Silvina por todo amor incondicional, obrigada por todo carinho que sempre tiveram por mim. Vou ama-los eternamente.

À todos os familiares que Deus colocou em meu caminho (Dona Lígia, Sr. Alexandre, Pelu, Alfredo, Xandrinho, Nana, meu eterno bebezinho Henry e Guga) por estarem sempre a meu lado torcendo por mim, vocês são muito especiais e importantes nessa trajetória, vocês são minha vida;

À Monica Souza, secretária da Pós-Graduação do Departamento de Pediatria, por estar sempre prontamente disposta para me auxiliar no que fosse preciso.

Aos bebezinhos e seus familiares participantes do projeto, obrigada pela confiança, sem vocês este trabalho não seria possível.

À FAPESP, por ter financiado o projeto e acreditado no investimento.

*“Se você encontrar um caminho sem obstáculos, ele provavelmente não leva
a lugar nenhum”*

Frank A. Clark

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	19
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Ética	21
3.2	Casuística	21
3.2.1	Critérios de inclusão	21
3.2.2	Critérios de exclusão	22
3.2.3	Critérios clínicos para sepse	23
3.3	Obtenção e processamento das amostras de sangue periférico	25
3.4	Dosagem de citocinas séricas	26
3.5	Extração do RNA total	27
3.6.	Análise da expressão diferencial dos genes da via de sinalização do NF- κ B	29
3.6.1.	Controle de Qualidade e Mapeamento	30
3.6.2.	Alinhamento e Anotação dos <i>Reads</i>	31
3.6.3	Expressão Diferencial	31
3.6.4	Análise Funcional e de Enriquecimento	32

3.7.	Validação da expressão dos genes MBL2, MMP9 e TREM1 por ensaio imunoenzimático (ELISA)	33
3.8	Análise Estatística	34
4.	RESULTADOS	36
4.1	Análise do grupo amostral	36
4.2	Citocinas séricas	40
4.3	Análise da Expressão Gênica Diferencial do Painel Customizado pela Metodologia RNASeq	41
4.3.1	Sepse por Gram-positivos vs. Controles	43
4.3.2	Sepse por Gram-negativos vs. Controles	46
4.3.3	Sepse clínica vs. Controles	49
4.4	Análise comparativa entre os dias de coleta	53
4.4.1	Sepse comprovada por bactérias Gram-positivas	53
4.4.2	Sepse comprovada por bactérias Gram-negativas	57
4.4.3	Sepse clínica	61
4.5	Análise da expressão diferencial como marcador de prognóstico	65
4.6	Validação funcional dos genes diferencialmente expressos por ensaio imunoenzimático	68
5.	DISCUSSÃO	76
6.	CONCLUSÕES	92
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Nomenclatura dos genes utilizados no estudo

ANEXOS

ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido HC-

FMUSP

ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UGA II - Hospital Ipiranga

ANEXO 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Hospital Geral e Maternidade de Cuiabá (MT)

ANEXO 4 – Aprovação do Comitê HC-FMUSP

ANEXO 5 – Aprovação do Comitê inclusão FMUSP

ANEXO 6 – Aprovação do Comitê UGA II - Hospital Ipiranga

ANEXO 7 – Aprovação do Comitê Hospital Geral e
Maternidade de Cuiabá (MT)

Lista de siglas, símbolos e abreviaturas

%	Porcentagem
↑ I/T	Índice neutrofílico
<	Menor
>	Maior
≤	Menor igual
≥	Maior igual
AIG	Adequados para a idade gestacional
Bpm	Batimentos por minuto
CBA	Cytometric Bead Array
cDNA	DNA complementar
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
CLEC	Lectina do tipo C
CTIN	Centro de tratamento intensivo neonatal
d	Dias
DEG	do inglês, Differential Expressed Genes
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DUM	Data da última menstruação
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
et al	E outros
FC	<i>FoldChange</i>
g	Unidade de aceleração força g
GBD	Global Burden of Diseases
G-CSF	Fator estimulador de colônias granulocitárias
GIG	Grandes para a idade gestacional
GO	Gene Ontology
h	Horas
HC/FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IFN-α	Interferon alfa
IFN-β	Interferon beta
IL-10	Interleucina 10
IL-12p70	Interleucina 12 heterodímero p70
IL-1ra	Receptor antagonico da Interleucina 1

IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-13	Interleucina 13
ILAS	Instituto Latino Americano de Sepse
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LIM-36	Laboratório de Investigação Médica em Pediatria Clínica do Instituto da Criança número 36
LPS	Lipopolissacarídeo
MFI	Mediana de Intensidade de Fluorescência
mg/dL	Miligramas por Decilitro
mg/L	Miligramas por Litro
ml	Mililitro
mm ³	Milimetro cúbico
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
MT	Mato Grosso
N	Neutrófilos
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Ng	Nanograma
ng/ μ L	Nanograma por microlitro
nm	Nanometro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
PCR	Proteína C reativa
PE	Fluorocromo ficoeritrina
pg/mL	Picograma por mililitro
REACTOME	Reactome Pathway Database
RIN	RNA Integrity Number
RN	Recém-nascido
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RRP	Receptor de reconhecimento de padrão
SCF Kit	do <i>inglês</i> , <i>Stem cell factor binds to the c- KIT receptor</i>

Th2	Célula T helper 2
TLR	<i>Toll-Like</i> receptor
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UGA II	Unidade de gestão assistencial II
UTIN	Unidade de terapia intensiva neonatal
μ l	Microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela - 1	Genes relacionados com a via de sinalização NF- κ B analisados no painel de expressão do <i>Kit TruSeq Targeted RNA Custom Panel</i>	30
Tabela - 2	Principais dados demográficos, clínicos e hematológicos dos RN com sepse comprovada e sepse clínica e dos RN do grupo controle	37
Tabela - 3	Resultados de culturas de líquidos estéreis dos RN diagnosticados com sepse comprovada	38
Tabela - 4	Concentrações séricas de citocinas dosadas por citometria de fluxo nas amostras de soro dos RN com sepse causada por bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas e com sepse clínica no dia do diagnóstico (0), 3 e 7 pós-diagnóstico e dos RN controle	41
Tabela - 5	Número de genes diferencialmente expressos em cada grupo de comparação	42
Tabela - 6	Identificação e valor de expressão (FC) dos genes diferencialmente expressos no grupo de RN com sepse por bactérias Gram-positivas vs. Controles	43
Tabela - 7	Análises de enriquecimento das ontologias gênicas (GO) nos genes hiper e hipoexpressos do grupo de RN com sepse causada por bactérias Gram-positivas	45
Tabela - 8	Identificação e valor de expressão (FC) dos genes diferencialmente expressos no grupo de RN com sepse por bactérias Gram-negativas vs. controles	46
Tabela - 9	Análises de enriquecimento das ontologias gênicas (GO) nos DEG do grupo de RN com sepse causada por bactérias Gram-negativas	48
Tabela - 10	Identificação e valor de expressão (FC) dos genes diferencialmente expressos no grupo de RN com sepse clínica vs. controles	50
Tabela - 11	Análises de enriquecimento das ontologias gênicas (GO) nos DEG do grupo de RN com sepse clínica	52
Tabela - 12	Identificação e valor de expressão (FC) dos genes diferencialmente expressos no dia 0 vs. 3, dia 0 vs. 7 e dia 3 vs. 7 pós-diagnóstico do grupo de RN com sepse causada por bactérias Gram-positivas	54
Tabela - 13	Análises de enriquecimento das ontologias gênicas (GO) dos DEG entre os dias 0, 3 e 7 pós-diagnóstico dos RN com sepse por bactérias Gram-positivas	56

Tabela - 14	Identificação e valor de expressão (FC) dos genes diferencialmente expressos no dia 0 vs. 3, dia 0 vs. 7 e dia 3 vs. 7 pós-diagnóstico do grupo de RN com sepse causada por bactérias Gram-negativas	58
Tabela - 15	Análises de enriquecimento das ontologias gênicas (GO) dos DEG entre os dias 0, 3 e 7 pós-diagnóstico dos RN com sepse por bactérias Gram-negativas	60
Tabela - 16	Identificação e valor de expressão (FC) dos genes diferencialmente expressos no dia 0 vs. 3, dia 0 vs. 7 e dia 3 vs. 7 pós-diagnóstico do grupo de RN com sepse clínica	62
Tabela - 17	Análises de enriquecimento das ontologias gênicas (GO) nos DEG do grupo de RN com sepse clínica entre os dias 0, 3 e 7	64
Tabela - 18	Identificação e valor de expressão (FC) dos genes diferencialmente expressos no grupo de RN que foram à óbito em relação aos que tiveram alta	66
Tabela - 19	Análises de enriquecimento das ontologias gênicas (GO) dos DEG dos casos que foram à óbito	68

LISTA DE FIGURAS

Figura - 1	Caracterização da resposta do hospedeiro á sepse. Produção de citocinas pró e anti-inflamatórias	3
Figura - 2	Via de sinalização do NF- κ B canônica e não canônica	14
Figura - 3	Diagrama do pipeline	33
Figura - 4	Porcentagem de RN dos grupos de sepse causada por bactérias Gram-positivas (Gram +), por bactérias Gram-negativas (Gram -) e sepse clínica no dia do diagnóstico com alterações em cada sistema	39
Figura - 5	Volcano plot representando o <i>Fold Change</i> (eixo x) versus a significância (eixo y) dos genes hipoexpressos e hiperexpressos nos RN com sepse por bactérias Gram-positivas, em todos os dias de coleta	44
Figura - 6	Volcano plot representando o <i>Fold Change</i> (eixo x) versus a significância (eixo y) dos genes hipoexpressos e hiperexpressos nos RN com sepse por bactérias Gram-negativas, em todos os dias de coleta	47
Figura - 7	Volcano plot representando o <i>Fold Change</i> (eixo x) versus a significância (eixo y) dos genes hipoexpressos e hiperexpressos nos RN com sepse clínica, em todos os dias de coleta	51
Figura - 8	Volcano plot representando o <i>Fold Change</i> (eixo x) versus a significância (eixo y) dos genes hipo e hiperexpressos nos RN com sepse causada por bactérias Gram-positivas (Gram P) no dia 0 comparado ao dia 3 (A), no dia 0 comparado ao dia 7 (B) e no dia 3 comparado ao dia 7 pós-diagnóstico (C)	55
Figura - 9	Volcano plot representando o <i>Fold Change</i> (eixo x) versus a significância (eixo y) dos genes hipoexpressos e hiperexpressos nos RN com sepse causada por bactérias Gram-negativas (Gram N) no dia 0 comparado ao dia 3 (A), no dia 0 comparado ao dia 7 (B) e no dia 3 comparado ao dia 7 pós-diagnóstico (C)	59
Figura - 10	Volcano plot representando o <i>Fold Change</i> (eixo x) versus a significância (eixo y) dos genes hiperexpressos e dos genes hipoexpressos nos RN com sepse clínica no dia 0 comparado ao dia 3 (A), no dia 0 comparado ao dia 7 (B) e no dia 3 comparado ao dia 7 pós-diagnóstico (C)	63
Figura - 11	Volcano plot representando o <i>Fold Change</i> (eixo x) versus a significância (eixo y) dos genes hipoexpressos e do gene hiperexpresso nos RN que foram à óbito em relação aos que tiveram alta	67

Figura - 12	Gráfico representando as concentrações médias do MBL2 solúvel (eixo y da esquerda) e valores de <i>Fold Change</i> (FC) (eixo y da direita) dos diferentes grupos de sepse (Gram-positivo, G+; Gram-negativo, G-; e sepse clínica) em relação aos controles obtidos por RNA-Seq para o gene <i>MBL2</i>	69
Figura - 13	Gráfico representando as concentrações médias do MMP-9 solúvel (eixo y da esquerda) e valores de <i>Fold Change</i> (FC) (eixo y da direita) dos diferentes grupos de sepse (Gram-positivo, G+; Gram-negativo, G-; e sepse clínica) em relação aos controles obtidos por RNA-Seq para o gene <i>MMP9</i>	70
Figura - 14	Gráfico representando as concentrações médias do Endocan solúvel (eixo y da esquerda) e valores de <i>Fold Change</i> (FC) (eixo y da direita) do grupo dos RN com sepse clínica em relação aos controles obtidos por RNA-Seq para o gene <i>ESM1</i>	71
Figura - 15	Gráfico representando as concentrações médias do TREM-1 solúvel (eixo y da esquerda) e valores de <i>Fold Change</i> (FC) (eixo y da direita) do grupo dos RN com sepse causada por bactérias Gram-negativas (G-) nos dias de coleta 0, 3 e 7 obtidos por RNA-Seq para o gene <i>TREM1</i>	72
Figura - 16	Gráfico representando as concentrações médias do IL-12 sérica (eixo y da esquerda) e valores de <i>Fold Change</i> (FC) (eixo y da direita) do grupo dos RN com sepse causada por bactérias Gram-positivas (G+) e por bactérias Gram-negativas (G-) nos dias de coleta 0 e 7 obtidos por RNA-Seq para o gene <i>IL12B</i>	73
Figura - 17	Gráfico representando as concentrações médias do TREM-1 solúvel (eixo y da esquerda) e valores de <i>Fold Change</i> (FC) (eixo y da direita) do grupo dos RN que foram à óbito em relação aos que tiveram alta por RNA-Seq para o gene <i>TREM1</i>	74

RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

NUNES FAMF. *Estudo da expressão de genes envolvidos na via do NF- κ B na sepse neonatal tardia*: valor potencial no diagnóstico e prognóstico [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Os avanços na terapia intensiva neonatal proporcionaram uma melhora na sobrevivência dos pacientes, entretanto a sepse ainda constitui uma das principais causas de mortalidade em recém-nascidos (RN). Até o momento, nenhum marcador biológico único apresentou vantagem significativa sobre outros para o diagnóstico da sepse neonatal. Deste modo, a disponibilização de um painel de biomarcadores gênicos, que possa diferenciar mais precocemente RN infectados dos não infectados e, ainda, identificar diferentes padrões de resposta causados por agentes etiológicos distintos, pode ter impacto significativo na morbimortalidade da sepse neonatal, contribuindo para a redução dos custos hospitalares e, ainda, diferenciar um bom ou mau prognóstico. O objetivo desse estudo é descrever a expressão de genes relacionados com a via de sinalização do fator nuclear *Kappa B* (NF- κ B) em RN com sepse tardia clínica e comprovadamente causada por bactérias Gram-positivas (G+) e Gram-negativas (G-), em três momentos diferentes: no dia do diagnóstico (dia 0), e após 3 e 7 dias de antibioticoterapia. Foram coletadas 32 amostras de sangue de RN distribuídas em grupos de acordo com o agente etiológico: com sepse causada por bactérias G+ (n =12); causada por bactérias G- (n =9); RN com sepse clínica (n = 11). O grupo controle foi composto por 21 amostras de RN sem sinais de infecção. A expressão gênica foi avaliada utilizando-se a metodologia RNA-Seq por meio de sequenciamento paralelo em larga escala de um painel de genes relacionados à via de sinalização do *NF- κ B*, utilizando o kit *TruSeq Targeted RNA Custom* (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), na plataforma *Illumina MiSeq*. Na análise, os fragmentos foram alinhados à referência hg38 do genoma humano utilizando o *software* STAR (PMID: 23104886). Para a normalização e análise da expressão diferencial, foi utilizado o *software* DESeq2 (PMID: 25516281). A avaliação do perfil de expressão gênica revelou 11 genes diferencialmente expressos (DEG) no grupo de sepse por G+, 22 genes no grupo G- e 12 genes no grupo de sepse clínica em relação aos controles. Os termos de ontologia gênica (GO) significativamente enriquecidos para esses genes estão associados à atividade de citocinas e ligação aos seus receptores, regulação da via de sinalização do *NF- κ B* e lúmen do grânulo terciário. Em todos os

grupos de sepse observamos a hiperexpressão do gene *MMP9* e a hipoexpressão do *CXCL2* e somente nos grupos de sepse comprovada por bactérias G+ e G-, a hiperexpressão do gene *MBL2*. No grupo G+, o gene *MMP9* apresentou hipoexpressão no dia 0 comparado aos dias 3 e 7 e *IL12B* apresentou hipoexpressão no dia 0 em relação ao dia 7. No grupo G-, foi observada a hiperexpressão do gene *TREM1* no dia 0 comparado aos dias 3 e 7 e também a hipoexpressão do *IL12B* no dia 0 em relação ao dia 7. No grupo de sepse clínica, foi observada hiperexpressão do gene *IRF1* no dia 0 comparado ao dia 3 e hipoexpressão do *FOXP3* no dia 3 comparado ao dia 7 pós-diagnóstico. Os DEG *MMP9*, *MBL2*, *IL-12B*, *ESM1* e *TREM1* foram selecionados e validados funcionalmente por meio da quantificação da proteína por ensaio imunoenzimático. Os resultados revelaram que os genes *MMP9* e *MBL2* são importantes para identificação dos casos de sepse comprovada e no grupo de sepse clínica, foi observado um perfil de expressão diferente, sem alteração na expressão do gene *MBL2*, porém com hiperexpressão do *IRF1*, sugerindo uma possível infecção viral ou bacteriana não identificada. O gene *TREM1* constitui um possível preditor de mau prognóstico para a sepse neonatal tardia. Os genes diferencialmente expressos *MMP9*, *MBL2* e *TREM1* codificam proteínas importantes, comprovadamente envolvidas na patogênese da sepse neonatal e apresentam potencial para serem utilizados como biomarcadores gênicos.

Descritores: Sepse neonatal; Expressão gênica; Citocinas; Lectina de ligação a manose; Metaloproteinase 9 da matriz; Receptor gatilho 1 expresso em células mieloides.

ABSTRACT

NUNES FAMF. *Study of genes' expression involved in the NF- κ B pathway in late-onset neonatal sepsis: potential value in diagnosis and prognosis* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

The advances in neonatal intensive care provided an improvement in patient survival, however sepsis still constitutes one of the main causes of mortality in the newborn (NB). So far, no single biological marker showed significant advantage over others for the diagnosis of neonatal sepsis. Thus, the availability of a panel of gene biomarkers, which could differentiate infected from non-infected NBs earlier and, which could also identify different response patterns caused by different etiologic agents, can have a significant impact on the morbidity and mortality of neonatal sepsis, contributing to the reduction of hospital costs and, also, differentiate a good or poor prognosis. The aim of this study is to describe gene expression related to the nuclear factor-*Kappa* B (NF- κ B) signaling pathway in NBs with clinical and culture-proven late-onset sepsis caused by Gram-positive (G+) and Gram-negative (G-) bacteria, at three different moments: on the day of diagnosis (day 0), and after 3 and 7 days of antibiotic therapy. Thirty-two blood samples were collected from NBs distributed in groups according to the etiologic agent: sepsis caused by G+ bacteria (n = 12); caused by G- bacteria (n = 9); NBs with clinical sepsis (n = 11). The control group was composed of 21 NB samples without signs of infection. Gene expression was evaluated using the RNA-seq methodology through large-scale parallel sequencing of a gene panel related to the NF- κ B signaling pathway, using the TruSeq Targeted RNA Custom Kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), on the Illumina MiSeq platform. In the analysis, the fragments were aligned to the hg38 reference of human genome using the STAR software (PMID: 23104886). For normalization and analysis of differential expression, the DESeq2 software (PMID: 25516281) was used. The evaluation of the gene expression profile revealed 11 differentially expressed genes (DEG) in the G+ sepsis group, 22 genes in the G- group and 12 DEG genes in the clinical sepsis group compared to controls. The terms of gene ontology (GO) significantly enriched for these genes are associated to cytokine activity and binding to its receptors, regulation of the NF- κ B signaling pathway and tertiary granule lumen. In all sepsis groups, we observed *MMP9* gene up-regulation and *CXCL2* down-regulation and solely in the culture-proven G+ and G- groups, the up-regulation of *MBL2*, as compared to controls. In the G+ group, *MMP9* gene was down-regulated on day 0 as compared to days 3 and 7 and *IL12B* was down-regulated

on day 0 relative to day 7. In G- group, *TREM1* gene was up-regulated on day 0 compared to days 3 and 7 and *IL12B* was also down-regulated on day 0 relative to day 7. In the clinical sepsis group, up-regulation of *IRF1* gene was observed on day 0 compared to day 3 and down-regulation of *FOXP3* on day 3 compared to day 7 post-diagnosis. The DEG *MMP9*, *MBL2*, *IL-12B*, *ESM1* and *TREM1* were selected and functionally validated by protein quantification by immunoenzymatic assay. The results revealed that *MMP9* and *MBL2* genes are important for the identification of culture-proven sepsis cases and in the clinical sepsis group, a different expression profile was observed, without alteration in the *MBL2* gene expression, however with *IRF1* over expression, suggesting a possible unidentified viral or bacterial infection. *TREM1* gene is a possible predictor of poor outcome for late neonatal sepsis. The differentially expressed genes *MMP9*, *MBL2* and *TREM1* encode important proteins, proven to be involved in the pathogenesis of neonatal sepsis and have the potential to be used as gene biomarkers.

Descriptors: Sepsis neonatal; Gene expression; Cytokines; Mannose-binding lectin; Matrix metalloproteinase 9; Triggering receptor expressed on myeloid cells-1.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A sepse é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no período neonatal e, recentemente, o estudo Global Burden of Disease 2016/2017 estimou 1,3 milhões de casos incidentes anuais de sepse neonatal em todo o mundo, resultando em 203.000 mortes (GBD, 2017). Uma revisão sistemática com estudo de meta-análise encontrou uma estimativa de 2.824 casos de sepse neonatal por 100.000 nascidos vivos no período analisado (antes de 1989 a 2018), com uma incidência 2,6 vezes maior de sepse precoce (2469/100.000) do que sepse tardia (946/100.000). A estimativa para mortalidade em caso de sepse neonatal geral foi de 17,6%, com 16,4% para sepse precoce e 9,1% para sepse tardia (Fleischmann et al., 2021). No Brasil, a proporção é estimada em 1 a 6 casos por 1000 nascidos vivos, com taxa de mortalidade entre 5 e 7% até os 27 dias de vida (Ministério da Saúde, 2018; França et al., 2017).

A sepse ocorre quando a resposta inflamatória ultrapassa a região inicialmente acometida, com uma liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias, que se torna desregulada e auto-sustentada. A resposta do hospedeiro à sepse é caracterizada pela produção de fatores pró e anti-inflamatórios e a extensão e duração dessas reações são determinadas por fatores do hospedeiro como características genéticas, idade, doenças coexistentes e uso de medicamentos e fatores patogênicos, como por exemplo, carga microbiana e virulência (Gotts et al., 2016).

As respostas inflamatórias são iniciadas pela interação entre padrões moleculares associados aos patógenos (do inglês *Pattern Recognition*

Receptors ou *PRRs*) e receptores de reconhecimento de padrões (do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns* ou *PAMPs*), expressos na membrana plasmática das células do hospedeiro. Esses receptores presentes em monócitos/macrófagos, células dendríticas e em neutrófilos são chamados *Toll-like*, mas há também outros, tais como: i. os receptores de lectina do tipo C (CLEC), localizados na membrana plasmática ou membrana endossomal; ii. receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (do inglês *NOD-like receptors*), localizados no citoplasma; e iii. receptores do tipo RIG-I (do inglês retinoic acid-inducible gene I), também expressos no citoplasma; e iv. e os novos receptores do tipo AIM2 (do inglês Absent in melanoma 2 (AIM)-like receptors, ALR), recentemente caracterizados como envolvidos no reconhecimento citosólico e nuclear de DNA de patógenos (Caneparo et al., 2018).

A consequência da inflamação exagerada é o dano ao tecido e a morte celular necrótica, que resulta na liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que perpetuam a inflamação, pelo menos em parte agindo nos mesmos receptores de reconhecimento de padrões que são acionados por patógenos (Nedeva et al., 2019) **(Figura 1)**.

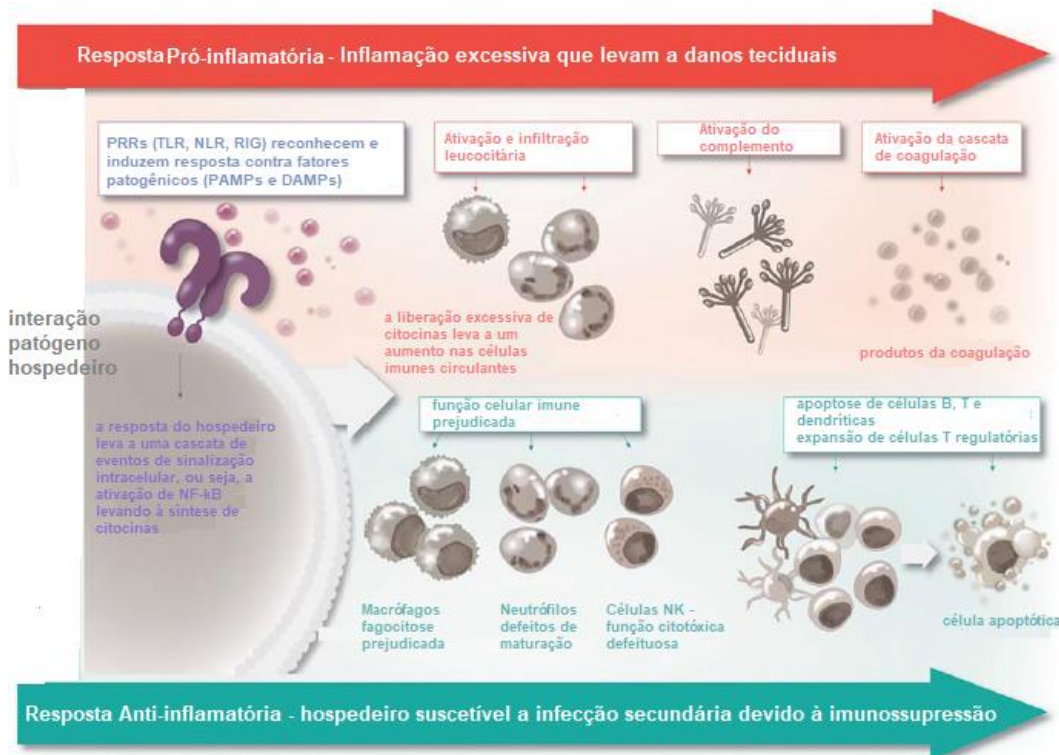


Figura 1. Caracterização da resposta do hospedeiro à sepse. Produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (Fonte: adaptação de Nedeva et al., 2019).

A resposta inflamatória desencadeada pela sepse é um mecanismo de defesa fundamental e, geralmente, funciona de maneira fisiológica, contribuindo para eliminação do patógeno e homeostase do organismo, garantindo que o patógeno seja eliminado sem que haja excessivo dano tecidual ou resposta exacerbada e permitindo a regeneração do tecido lesado.

Grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β ganham a corrente sanguínea, causando febre, vasodilatação, leucocitose e induzindo a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, que perpetuam a cascata. Há também ativação do sistema de coagulação e de fibrinólise, que pode culminar com a coagulação intravascular disseminada (CIVD). Todo esse processo leva à lesão e comprometimento das funções celulares, precursores

das disfunções orgânicas que caracterizam os quadros mais graves da sepse e que podem levar ao óbito (Gotts et al., 2016). Portanto essa patogênese está associada a alterações fisiológicas, hemodinâmicas, distúrbios da microcirculação e alterações celulares que causam o desequilíbrio entre as necessidades metabólicas do tecido e fluxo sanguíneo, podendo levar a disfunções de múltiplos órgãos e, em última instância, choque séptico que é responsável pela forma grave e frequentemente fatal da doença (Celes et al., 2012).

O choque séptico leva à vasodilatação e aumento da permeabilidade sistêmica, com extravasamento de líquido para o espaço extra-vascular e queda da pressão arterial, tanto pela hipovolemia relativa, quanto pelo efeito vasodilatador dos mediadores liberados. Devido a isso, o tratamento adequado passa pela identificação precoce do agente causador e tratamento da sepse muito antes da hipotensão (Emr et al., 2018).

A resposta do organismo frente a este processo inflamatório pode ser de início precoce ou tardio (após 72 horas até 27 dias completos), podendo ser sutil e inespecífica no começo da infecção, sendo confundida como uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (do inglês, *Systemic Inflammatory Response Syndrome* - SIRS). Apesar disso, a sepse pode ter evolução fulminante e levar a choque séptico, coagulação intravascular disseminada e óbito em poucas horas (Dellinger et al., 2008; Cianciarullo et al., 2008; Matsuda et al., 2012).

Os critérios diagnósticos da sepse neonatal ainda são baseados no consenso da Conferência Internacional de Consenso em Sepse pediátrica,

publicado em 2005, que estabelece como definição de sepse a presença de infecção, confirmada ou suspeita, em um contexto de SIRS (Goldstein et al., 2005). O consenso ainda traz a definição de sepse grave: sepse associada à disfunção cardiovascular ou disfunção respiratória ou ainda, duas ou mais disfunções de órgãos e sistemas; e a definição de choque séptico: sepse associada à falência cardiocirculatória (taquicardia, tempo de enchimento capilar menor que três segundos, hipotensão, necessidade de reposição volêmica e uso de substâncias vasopressoras). É importante lembrar que esses critérios foram originalmente descritos para adultos, e que na criança e nos neonatos a apresentação clínica pode ser sutil, exigindo alta suspeição diagnóstica para a identificação e intervenção precoce. O conceito de sepse grave foi, então, extinto, e o choque séptico passou a ser definido como um subtipo de sepse em que há hipotensão com necessidade de drogas vasopressoras associada a hiperlactatemia (Singer et al., 2016).

A conduta terapêutica diante de um possível quadro clínico de sepse, com administração precoce de antibioticoterapia adequada, pode reduzir drasticamente a mortalidade. É imprescindível a distinção rápida de pacientes com sepse daqueles com causas não infecciosas, que necessitam de diferentes tratamentos, assim é possível suspender o tratamento nos casos em que a suspeita de sepse não for confirmada, racionalizando o uso de antimicrobianos e retirando mais precocemente os antibióticos com segurança para evitar, com isso, a resistência bacteriana (Laxminarayan et al., 2016; Klingenberg et al., 2018). Talvez não seja surpresa, portanto, que a busca por um biomarcador para a sepse com alta precisão tornou-se um dos objetivos primordiais da medicina mundialmente.

A avaliação de pacientes com sepse requer a combinação de dados clínicos e laboratoriais. O diagnóstico desse tipo de infecção pode ser particularmente difícil em RN pelo fato dos sinais e sintomas serem confundidos com outras situações clínicas como, por exemplo, cardiopatia congênita grave (Brasil, Ministério da Saúde, 2014).

Inúmeros estudos têm verificado que a contagem de leucócitos totais, o número de formas jovens sobre o total de neutrófilos (índice neutrofílico), a contagem de plaquetas e as concentrações séricas da Proteína C Reativa (PCR) solicitados rotineiramente na investigação de processos inflamatórios e infecciosos, possuem baixa sensibilidade e especificidade, porém, até o presente, constituem as ferramentas laboratoriais de rotina disponíveis para o diagnóstico de sepse neonatal (Pinheiro et al., 2007; Ministério da Saúde, 2018).

Outros marcadores de fase aguda, tais como a procalcitonina são relatados como úteis para diferenciar sepse clínica de sepse comprovada em crianças (Arkader et al., 2006). Uma acurácia diagnóstica moderada de outras proteínas de fase aguda tais como, proteína amiloide A sérica, proteína ligante de lipopolissacarídeo - LBP, lectina ligante de manose – MBL e hepcidina também já foi demonstrada (Jacquot et al., 2009; Israëls et al., 2010; Mostafa et al., 2011; Wu et al., 2013; Leante-Castellanos et al., 2015). Além disso, as citocinas pró-inflamatórias também se encontram alteradas em processos inflamatórios e infecciosos, mas ao menos por enquanto, são investigadas apenas em projetos de pesquisa (Ceccon et al., 2006; Magrini et al., 2014).

Dentre os testes diagnósticos empregados atualmente, os isolamentos microbianos em cultura de sangue periférico (hemoculturas), de fluido cefalorraquidiano ou urina ainda constituem o teste de referência para o diagnóstico de sepse. Entretanto, o cultivo requer tempo significativo para a definição do diagnóstico, com excelente especificidade, porém baixa sensibilidade. Além disso, fatores como baixa bacteremia, a profilaxia antimicrobiana para prevenção da infecção causada por *Streptococcus* do grupo B no final da gestação e/ou durante o parto ou para a criança após o nascimento, e a coleta de pouco volume de sangue do RN são citadas como possíveis causas da baixa frequência de resultados positivos (Meireles et al., 2011).

Até o momento, nenhum marcador único apresenta vantagem significativa sobre os outros para o diagnóstico da sepse neonatal. Os parâmetros avaliados para um diagnóstico adequado (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo) determinam a validade de um teste clínico: um método de diagnóstico deve possuir uma sensibilidade aceitável ($\pm 80\%$), uma excelente especificidade e valor preditivo negativo de $\pm 100\%$ (Ng e Lam, 2010).

O futuro dos biomarcadores na sepse encontra-se em estudos extensivos de validação e uma maior exploração de combinações de moléculas que podem proporcionar um meio de melhorar a sensibilidade e especificidade, aumentando a capacidade de diagnóstico e prognóstico para os clínicos. A sepse é uma síndrome inflamatória extremamente complexa e heterogênea, por isso faz sentido que uma combinação de biomarcadores seja a abordagem

mais provável para incorporar essa heterogeneidade e comprovar o diagnóstico, do que um único biomarcador (Sandquist et al., 2014).

Além disso, a validação de biomarcadores isolados e combinados exige exploração em populações heterogêneas como adultos, crianças ou neonatos. É importante reconhecer que os biomarcadores que são altamente úteis para uma população, podem não ter as mesmas características em outra população e, conseqüentemente, estudos de validação devem ser altamente críticos para otimizar o teste ideal para cada grupo de pacientes, especialmente em RN que apresentam diferenças fisiológicas em relação às crianças mais velhas e aos adultos (Sandquist et al., 2014).

Atualmente a melhor combinação de marcadores descrita para o diagnóstico de sepse neonatal consiste na dosagem de IL-6 e IL-1ra, um a dois dias antes do início dos sintomas; IL-6 (ou IL-1ra, IL-8, CD11b, CD64, G-CSF, TNF- α), PCR, procalcitonina e índices hematológicos no dia 0; PCR, índices hematológicos e procalcitonina nos dias seguintes para monitorar a resposta à antibioticoterapia (Chirico e Loda, 2011; Weinberg e D'Angio, 2011). No entanto, a procalcitonina tem baixa sensibilidade e especificidade para prever mortalidade (Pettila et al., 2002).

Em geral, os resultados destes estudos têm mostrado um pequeno aumento no valor preditivo positivo em comparação com a maior parte dos testes de *screening* individuais, embora o valor preditivo negativo seja notavelmente bom, se aproximando de 100% em alguns estudos. Por causa do alto valor preditivo negativo, painéis de triagem pode produzir uma diminuição significativa do uso de agentes antimicrobianos. Com a sua utilização, menos

neonatos receberiam agentes antimicrobianos e o tratamento com antibióticos poderia ser interrompido mais cedo e com mais confiança (Benitz, 2010; Weinberg e D'Angio, 2011).

Deve ser enfatizado, contudo, que testes de *screening* destinam-se apenas para dar suporte à avaliação clínica. Quando as evidências obtidas pela história ou exame físico entram em conflito com resultados laboratoriais negativos, a terapia antimicrobiana deve ser iniciada. Assim, sinais clínicos de sepse ainda são os critérios mais importantes para a utilização de antibióticos.

Dadas as limitações dos estudos em nível proteico, alguns trabalhos vêm utilizando uma abordagem genômica para compreender mais profundamente a complexidade biológica inerente da sepse, ainda com a possibilidade de identificar novos mecanismos biológicos e alvos terapêuticos (Wong et al., 2007; Shanley e Wong, 2003).

Atualmente, a disponibilidade de plataformas tecnológicas de alta capacidade, conhecidas como “ômicas”, tais como a genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, que têm como objetivo isolar e caracterizar, respectivamente, o DNA, mRNA, as proteínas e os metabólitos, fornecem uma importante base para a descoberta e desenvolvimento de novos biomarcadores.

A abordagem, conhecida como *Genome Wide Expression Profile* (GWEP), tem sido utilizada para auxiliar no diagnóstico de sepse em crianças e adultos (Tang et al., 2010). GWEP é o estudo da expressão gênica baseando-se em dados de *microarrays* ou de sequenciamento paralelo em larga escala. Essas técnicas determinam qual o perfil de transcrição dos genes em um

determinado tipo de célula ou tecido, condição, doença ou fenótipo. Em estudo realizado com neonatos de baixo peso, os resultados preliminares sugerem que neonatos com sepse apresentam um perfil de expressão gênica diferente dos controles e essa expressão diferencial poderia auxiliar no diagnóstico mais precoce da sepse neonatal (Cernada et al., 2014).

RNA-seq é uma metodologia de sequenciamento de alta performance (high throughput sequencing, HTS), em que uma biblioteca de cDNAs é construída a partir de fragmentos de mRNA retirados de amostras biológicas, caracterizando o transcriptoma daquela célula ou tecido (Griffith et al., 2015; Wang et al., 2009). Essa metodologia apresenta ampla distribuição em diversas áreas da ciência, principalmente o desenvolvimento de sequenciadores cada vez mais avançados, chamados na literatura por *Next Generation Sequencing* (NGS), os quais possuem a capacidade de ler a informação genética das diferentes bibliotecas de cDNA em paralelo e de forma maciça, liberando tais leituras (*reads*) de forma acurada e eficiente (Khatoon et al., 2014; Nowrousian, 2010).

Desta forma, a análise transcriptômica pela metodologia de RNA-Seq possui vantagens sobre a análise de *microarrays* (microarranjos), dentre as quais, a alta qualidade de leitura dos transcritos (*reads*), redução de replicatas técnicas em experimentos e uma quantificação rápida e acurada (Agarwal et al., 2010), com ferramentas computacionais e estatísticas bem estabelecidas (Garber et al., 2011; Perteza et al., 2016; Trapnell et al., 2010), além de um custo menor a cada ano, que pode, ainda, ser mais reduzido utilizando-se painéis direcionados com genes específicos para a doença a ser estudada.

Em pacientes adultos com choque séptico, por exemplo, está descrito uma hiper-regulação de genes expressos relacionados com a imunidade inata e inflamação persistente no terceiro dia, comparada com pacientes com sepse ou SIRS restabelecidos ou curados (Wong et al., 2009).

Outro estudo recente usando GWEP em crianças com choque séptico de 0 a 10 anos, divididas em quatro grupos, de acordo com a idade, demonstrou um padrão de expressão diferencial dos genes de acordo com a idade. No grupo de RN, foi encontrada uma baixa expressão do gene do receptor de células B (BCR), de sTREM e de genes relacionados com a via de sinalização do Fator Nuclear-*Kappa* B (NF- κ B), quando comparados aos outros grupos (Wynn et al., 2011).

Um recente artigo revelou a expressão diferencial, analisada por microarray, de 1128 mRNAs hiper-regulados e 1008 mRNAs hipo-regulados na sepse neonatal e a construção de uma rede de integração da interação proteína-proteína (do inglês *Integration of the Protein-Protein Interaction, PPI*) identificou genes reguladores importantes, entre eles, *ITGAM*, *ITGAX*, *TLR4*, *ITGB2*, *SRC*, *ELANE*, *RPLP0*, *RPS28*, *RPL26* e *RPL27* envolvidos na regulação do extravasamento celular, na resposta inflamatória aguda, ativação da via de sinalização NF- κ B, via de sinalização do TNF, via de sinalização HIF-1 (fator 1 induzível por hipóxia), via de sinalização do receptor *Toll-like* e ribossomo, transporte de RNA e spliceossomo (Bu et al., 2020).

A regulação da resposta imune inata é conseqüente de um delicado balanço e, portanto, reações imunes desreguladas, seja por falta ou por excesso, acarretam dramáticas conseqüências para o hospedeiro infectado,

como bem visto na sepse grave (Machado et al., 2014). Embora diversos fatores de transcrição estejam envolvidos na alteração da transcrição gênica observada na sepse, incluindo o fator de transcrição proteína de ativação-1 (AP-1), o fator mais estudado é o NF- κ B. O NF- κ B é um fator de transcrição crucial para o funcionamento do sistema imune normal, regulando a ativação dos genes necessários para uma resposta rápida e apropriada. Entretanto, a ativação inadequada, elevada e/ou prolongada do NF- κ B resulta em hiperexpressão de proteínas que podem causar efeitos deletérios (Cuenca et al., 2013).

A via do fator nuclear NF- κ B tem sido considerada uma via de sinalização inflamatória prototípica, baseada no papel deste fator de transcrição sobre a expressão de genes pró-inflamatórios que codificam citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (Lawrence, 2009). A expressão desses genes é importante para diversos processos biológicos incluindo inflamação, apoptose, proliferação e para o desenvolvimento dos órgãos linfoides (Savinova et al., 2009). O complexo NF- κ B é formado por cinco membros: RelA (p65), RelB, cRel, NF- κ B1 (p50) e NF- κ B2 (p52), que se associam e formam complexos diméricos que induzem a transcrição de diversos genes (Cildir et al., 2016).

Existem duas vias de ativação de NF- κ B: a clássica, desencadeada por produtos microbianos e citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 β , geralmente levando à ativação de complexos contendo RelA ou cRel e a alternativa, ativada por receptores para Linfotóxina β (LT β), CD40L, fator de ativação de células B (BAFF) e ligante do receptor ativador do NF- κ B (RANKL),

resultando na ativação dos complexos RelB/p52 (**Figura 2**). As duas vias diferem por meio da ativação de diferentes I κ B quinases (Lawrence, 2009).

Resumidamente, na via clássica (ou canônica), as proteínas NF- κ B/Rel são ligadas e inibidas pelas proteínas I κ B. Conforme mencionado anteriormente, citocinas pró-inflamatórias, LPS, fatores de crescimento e receptores de antígenos, após uma cascata de sinalização, ativam um complexo IKK (IKK β , IKK α e IKK γ - NEMO), que fosforila as proteínas I κ B. A fosforilação de I κ B conduz à sua ubiquitinação e degradação proteossomal, libertando complexos NF- κ B/Rel. Os complexos ativos de NF- κ B/Rel são ainda ativados por modificações pós-translacionais (fosforilação, acetilação, glicosilação) e translocados para o núcleo onde, isoladamente ou em combinação com outros fatores de transcrição, incluindo AP-1, induzem à expressão do gene alvo.

Na via alternativa (ou não canônica) do NF- κ B, os complexos NF- κ B2 p100/RelB estão inativos no citoplasma. A sinalização através de um subconjunto de receptores, incluindo LT β R, CD40 e BR3, ativa a quinase NIK, que por sua vez ativa os complexos IKK α que fosforilam os resíduos C-terminais em NF- κ B2/p100. A fosforilação de NF- κ B2/p100 leva à sua ubiquitinação e processamento proteossomal, gerando o NF- κ B2/p52. Isto gera complexos transcricionalmente competentes de NF- κ B p52/RelB, que se translocam para o núcleo e induzem à expressão de genes alvo (Mitchell et al., 2016).

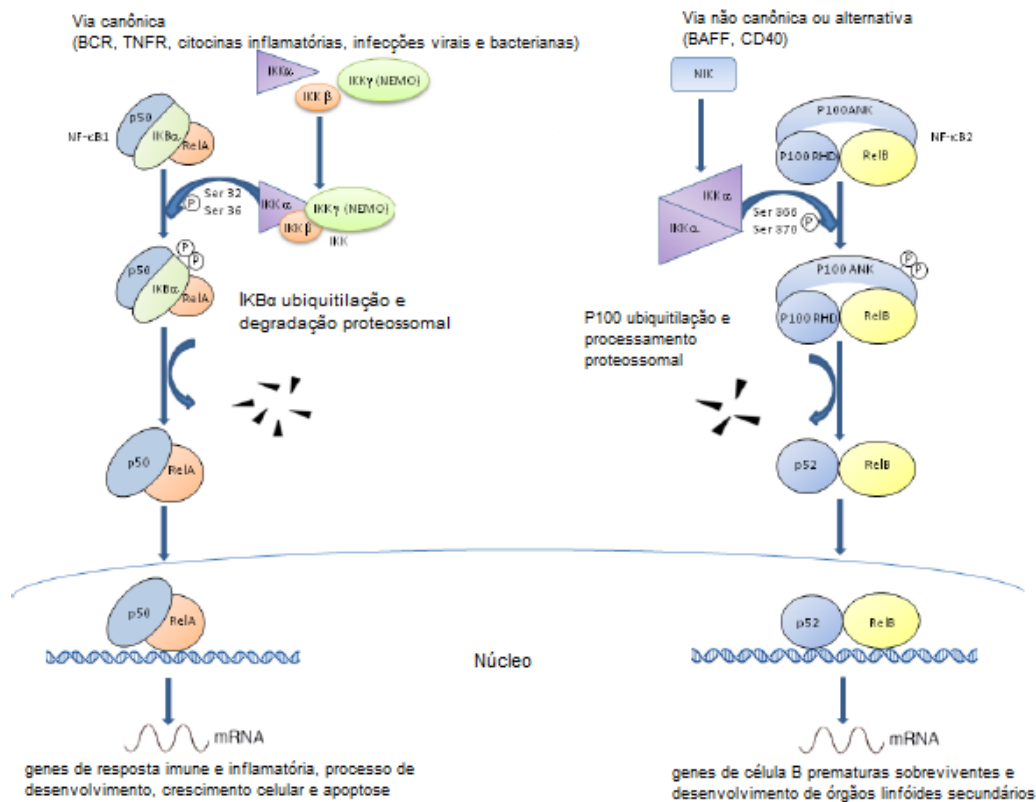


Figura 2. Via de sinalização do NF-κB canônica e não canônica. A via canônica induz a ativação de moléculas de NF-κB ligadas ao IκB (como RelA/p50 ou cRel/p50) por meio da ativação do complexo IKK multimérico, formado por IKKα, IKKβ e IKKγ/NEMO; esta ativação resulta na fosforilação (P) de IκBα, sua ubiquitilação (Ub) e subsequente degradação pelo proteossoma 26S, liberando o complexo NF-κB para o núcleo. A via não canônica depende da ativação de dímeros IKKα apenas (Fonte: adaptação de Maddona et al., 2012).

Estudos demonstram que as terapias que interferem na ativação do NF-κB podem proporcionar benefícios aos pacientes com sepse. Abordagens para modular fatores de transcrição que desempenham um papel crítico na ativação de outras vias pró-inflamatórias e ativar ou inibir moléculas que fazem parte da cascata de sinalização da imunidade inata, que culminam na produção de citocinas inflamatórias, são perspectivas em futuras pesquisas no desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias (Kock et al., 2018).

Justificativa

Apesar dos avanços na assistência perinatal e neonatal e do uso de antibióticos potentes, a incidência de sepse neonatal permanece alta e o prognóstico ainda é grave. A maior parte das complicações da sepse neonatal em curto (como SIRS, coagulação intravascular disseminada, choque séptico e síndrome da disfunção de múltiplos órgãos) e em longo prazo (complicações respiratórias, de crescimento e sequelas neurológicas) é estritamente associada aos efeitos dos fatores inflamatórios, como citocinas e fatores de crescimento, e os seus mediadores secundários, incluindo o óxido nítrico, tromboxanos, leucotrienos, fator de ativação de plaquetas, prostaglandinas e complemento não contrabalançados por uma síntese adequada de citocinas e seus receptores anti-inflamatórios, como TNFR, IL-1ra, IL-1RII, IL-10 e TGF- β 2 (Chirico e Loda, 2011).

Diferentes moléculas têm sido propostas como marcadores de gravidade e/ou prognóstico para sepse, incluindo proteínas de fase aguda (proteína C reativa, procalcitonina), fatores de coagulação (produtos de degradação da fibrina, anti-trombina III), marcadores celulares de membrana (HLA-DR, E-selectina), receptores solúveis (sTNFR-I, sTNFR-II) e citocinas (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10) (Delanghe e Speeckaert, 2015). Entretanto, apenas alguns marcadores têm sido aplicados com sucesso em última análise, em estudos clínicos, tais como a PCR e a procalcitonina. Os dados até o momento, no entanto, são ainda insuficientes para considerar alguns destes fatores úteis para a avaliação do risco de desenvolver sepse, ou para incluí-los nos painéis

de rastreio atualmente usados para o diagnóstico precoce ou para orientar no tratamento da infecção no RN.

Padrões de expressão gênica são cada vez mais utilizados para ampliar o conhecimento de doenças complexas e heterogêneas, que têm grandes variações na resposta do hospedeiro e, portanto, no prognóstico. Essa abordagem tem sido utilizada, por exemplo, em crianças com choque séptico para identificar, com êxito, padrões de expressão de mRNA, os quais visam o aumento da precisão do diagnóstico, preveem a gravidade da sepse, estratificam a doença e identificam novas vias de sinalização (Ramilo et al., 2007; Wong et al., 2007; Wong et al., 2009).

Como na maior parte dos casos de sepse neonatal, as hemoculturas resultam negativas, a disponibilização de um painel de biomarcadores gênicos, que possa diferenciar mais precocemente recém-nascidos infectados dos não-infectados e, ainda, identificar diferentes padrões de resposta causados por agentes etiológicos distintos, pode causar impacto significativo na morbimortalidade da sepse neonatal, contribuindo para a redução dos custos hospitalares devido ao uso desnecessário de antibióticos, reduzir o tempo de internação e, ainda, diferenciar um bom ou mau prognóstico.

Além disso, as coletas temporais (em 3 tempos) permitem a avaliação das mudanças dinâmicas nos padrões de transcrição gênica associados às várias fases da sepse e um monitoramento da resposta ao antibiótico. Os marcadores gênicos, hipo ou hiperexpressos, poderão auxiliar no conhecimento da resposta individual, o que poderia explicar porque um RN com o mesmo tipo de infecção evolui de formas diferentes. Estamos, em última

análise, interessados em determinar se existem ou não perfis biologicamente significativos de expressão gênica que distinguem os sobreviventes dos não sobreviventes do choque séptico, assim como diferentes perfis de resposta de acordo com o tipo de patógeno. A justificativa para a realização do estudo é utilizar a expressão diferencial de alguns genes da via do NF- κ B e através disso, identificar novos biomarcadores que possam ser utilizados futuramente no auxílio de um rápido e preciso diagnóstico, assim como antever o prognóstico, utilizando técnicas mais ágeis, direcionadas e de baixo custo.

Hipótese

Consideramos que, com a combinação dos genes da via do NF- κ B selecionados para este estudo, obteremos um valor potencial no diagnóstico e prognóstico da doença e compreenderemos melhor as diferenças nas respostas induzidas por diferentes patógenos na sepse neonatal tardia.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Descrever a expressão de genes envolvidos na via de ativação celular do NF- κ B em recém-nascidos com sepse tardia clínica e comprovada causada por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, no dia do diagnóstico (dia 0), na fase intermediária (dia 3) e na fase de convalescência (dia 7).

2.1. Objetivos específicos

1. Avaliar a expressão diferencial dos genes nas amostras dos RN com sepse clínica e comprovada em todos os dias de coleta (0, 3 e 7) em relação aos RN do grupo controle;
2. Monitorar a resposta ao antibiótico por meio da avaliação da expressão diferencial dos genes nas amostras dos RN de cada grupo de sepse, comparando-se os dias 0, 3, e 7 pós-diagnóstico;
3. Avaliar a expressão diferencial dos genes como marcador prognóstico, por meio da comparação entre os casos que tiveram alta hospitalar e os que foram à óbito;

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Ética

O presente projeto (CAAE: 53495516.6.0000.0068) obteve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Parecer nº: 1.486.313 em 11/04/16) e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Parecer nº: 1.970.557 em 21/03/17). O projeto também conta com a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do UGA II - Hospital Ipiranga, como centro coparticipante do estudo (Parecer nº: 2.779.182 em 20/07/18) e de outro centro co-participante, o Hospital Geral e Maternidade de Cuiabá (MT) (Parecer nº: 2.937.543 em 08/10/18). Após a apresentação minuciosa do trabalho, todos os pais ou responsáveis legais pelos pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido em que confirmavam estar inteiramente de acordo em participar deste estudo.

3.2. Casuística

3.2.1 Critérios de inclusão

A população de estudo foi constituída por recém-nascidos que apresentaram manifestações clínicas e laboratoriais de sepse neonatal tardia (considerada como aquela que se manifesta após o terceiro dia de vida). Os grupos foram compostos por 12 amostras de RN com sepse causada por bactérias Gram-positivas, 9 RN com sepse causada por bactérias Gram-

negativas e 11 RN com sepse clínica, ou seja, sem identificação do patógeno. O grupo controle foi composto por 21 amostras de RN que deram entrada no Serviço com suspeita de sepse, para investigação clínica e cuja hemocultura e sinais e sintomas sugestivos de sepse foram descartados. Nesses RN controle, foi realizada apenas uma coleta, em um só tempo.

A idade gestacional de todos os RN foi determinada considerando-se a informação materna da data da última menstruação (OMS-1976) e, na ausência, a USG fetal quando realizada até a 20ª semana gestacional. Os métodos de Capurro (1978) para os RN a termo e New Ballard (1991) para os RN pré-termo foram utilizados para avaliação clínica da idade gestacional, em casos de dúvida sobre a DUM, ausência de exame ultrassonográfico ou datação ultrassonográfica tardia na gestação. Em relação à adequação do peso para a idade gestacional foi utilizada a curva de Alexander (1996) e classificados em relação ao peso. Foram considerados como PIG (pequenos para idade gestacional) aqueles abaixo do percentil 10, AIG (adequados para a idade gestacional) aqueles entre o percentil 10 e 90 e GIG (grandes para a idade gestacional) aqueles acima do percentil 90 e de baixo peso, quando inferiores a 2000g.

3.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos os RN com idade gestacional abaixo de 34 semanas e com diagnóstico de infecções congênitas, RN sindrômicos, com erros inatos do metabolismo (que por si só alterariam a resposta imunológica), uma vez que todos esses eventos poderiam alterar os resultados da pesquisa.

3.2.3 Critérios clínicos para sepse

Para o diagnóstico de sepse, foram utilizados os critérios citados por Goldstein et al. (2005), mantidos na *Surviving Sepsis Campaign* (Weiss et al., 2020), que em 2020 manteve o conceito de 2005 para neonatos, que leva em consideração a presença de, pelos menos, duas das seguintes condições:

A. *Instabilidade térmica:* hipotermia, com temperatura axilar $< 36^{\circ}\text{C}$ ou hipertermia, com temperatura axilar $> 38^{\circ}\text{C}$.

B. *Alterações respiratórias:* cianose, gemência, respirações irregulares, crises de apnéia ou taquipnéia (frequência respiratória > 50 bpm), retrações de xifoide ou intercostais, batimento de asa de nariz, necessidade de aumento progressivo dos parâmetros ventilatórios, necessidade de maiores frações inspiratórias de oxigênio.

C. *Alterações cardiovasculares:* palidez, cianose, pele fria e viscosa, arritmia, edema, bradicardia (frequência cardíaca < 100 bpm), taquicardia (frequência cardíaca > 180 bpm), perfusão periférica lentificada com tempo de enchimento capilar > 3 segundos, hipotensão arterial com necessidade de expansão para manter euvolemia ou necessidade de aumento de dose das drogas inotrópicas para manter a pressão adequada e sustentada.

As alterações hematológicas foram avaliadas pelo hemograma completo e os valores de referência para RN são:

Leucopenia ou Leucocitose

- Leucopenia ≤ 5.000 ; Leucocitose $\geq 48\text{h}$: ≥ 21.000

Alguns exames laboratoriais podem ainda nos auxiliar no diagnóstico da sepse como a neutrofilia e/ou neutropenia e índice neutrofílico (neutrófilos imaturos/total de neutrófilos):

Quadro 1. Neutropenia ou Neutrofilia para RN maiores que 1500g

Horas de vida	Neutropenia	Neutrofilia	↑ N Imaturos	↑ I/T
72h	<1.800	>7.000	>550	>0,13
120h-28d	<1.800	>5.400	>500	>0,12

h = horas; d = dias; N = neutrófilos; ↑ I/T = Índice neutrofílico (aumento de neutrófilos imaturos /totais).

- Aumento de neutrófilos imaturos
- Alterações degenerativas dos neutrófilos com granulação tóxica ou vacuolização
- Plaquetopenia: Plaquetas <150.000/mm³

Além disso, em todos os RN, a dosagem de Proteína C reativa (PCR) é realizada de rotina no diagnóstico e para acompanhar o tratamento, sendo considerada como representativa de infecção quando ≥ 10 mg/L (da Silva et al., 1995; Vaz et al., 1998; Mathai et al., 2004). O valor de referência do nosso serviço para o lactato é 4,5 a 28,8 mg/dL. Segundo o ILAS, a bilirrubina direta é indicativa de infecção quando está > 2 mg/dL (Instituto Latino-Americano para Estudos da Sepse, 2015).

Nos RN, devido à dificuldade de diagnóstico, devemos observar as alterações do sistema nervoso central, as gastrintestinais, da pele e subcutâneo, do sistema hematopoiético e alterações em imagens radiológicas (Raios-X, ultrassom, tomografia, ecocardiograma).

Além dos critérios descritos acima, para o diagnóstico de sepse comprovada são realizados os seguintes exames para pesquisa para bactérias e fungos: i. hemocultura, que consiste no “padrão ouro” para comprovação de sepse; ii. cultura de líquido cefalorraquidiano (LCR) e; iii. cultura de urina.

Choque séptico foi definido como infecção grave levando a disfunção cardiovascular (incluindo hipotensão, necessidade de tratamento com drogas vasoativas ou perfusão prejudicada). A hipotensão foi definida como pressão arterial abaixo do percentil 5 dos valores de pressão arterial para idade gestacional e pós-natal (Weiss et al., 2020).

Os exames laboratoriais e de imagem fazem parte da rotina para RN com suspeita de infecção e todos foram realizados no Laboratório Clínico do Instituto Central ou do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, ou nos laboratórios de rotina de cada centro de coleta de nosso estudo.

3.3. Obtenção e processamento das amostras de sangue periférico

As amostras foram colhidas na mesma coleta de exames quando os RN chegaram à CTIN para avaliação clínica, sendo considerado como o dia do diagnóstico (dia 0). Após 72 horas de tratamento, foi coletado novo controle da infecção, conforme protocolo do serviço, sendo considerado como fase

intermediária (dia 3) e uma nova coleta foi realizada na fase de convalescença (dia 7), para determinar a duração do tratamento ou a necessidade de troca de antibiótico.

Para a realização de todos os testes foram coletadas amostras de sangue periférico sendo, 1 mL em tubo PAXgene™ (PAXgene RNA collection tubes – PreAnalytiX, BD Alemanha) para extração de RNA e 1 mL em tubo com gel separador para os experimentos de ELISA e citometria de fluxo (CBA).

3.4. Dosagem de citocinas séricas

As dosagens de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e TNF- α foram realizadas pelo método de citometria de fluxo (*Cytometric Bead Array* – CBA, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), segundo instruções do fabricante, no LIM-36 (Laboratório de Pediatria Clínica do Instituto da Criança do HC-FMUSP). Resumidamente, no teste foram usados 25 μ L das amostras de soro adicionadas a um *pool* de *beads* de captura específicas para todas as citocinas citadas. Também foi acrescentado 25 μ L do reagente de detecção conjugado ao fluorocromo ficoeritrina (PE). Esses mesmos reagentes foram adicionados às diluições seriadas dos padrões das citocinas. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente e protegidos da luz, todos os tubos foram lavados e analisados no citômetro de fluxo, de acordo com a intensidade de fluorescência de cada *bead* de captura para cada citocina. Foram salvos 2.000 eventos no *gate* P1. As concentrações dessas citocinas nas amostras foram determinadas através da Mediana de Intensidade de Fluorescência (MFI) do PE e baseadas

na curva padrão obtida para cada citocina, e os resultados expressos em pg/mL.

3.5. Extração do RNA Total

As coletas das amostras dos pacientes e controles foram realizadas através da punção venosa de aproximadamente 1 mL de sangue periférico em tubo *PAXgeneTM* (PAXgene RNA collection tubes – PreAnalytiX, BD Alemanha) para a extração de RNA. Os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 2 horas para estabilização do RNA e após este período foram armazenados a -80°C, até o momento da extração, segundo protocolo do fabricante. A extração do RNA foi realizada utilizando-se o kit de extração *PAXgene RNA Blood Kit* (PreAnalytiX, BD Alemanha). Resumidamente, após o descongelamento dos tubos de amostra por aproximadamente 2 horas de repouso em posição vertical, o protocolo se iniciou com a centrifugação dos tubos por 10 minutos a 4000 x g. Foram desprezados os sobrenadantes e adicionou-se aos *pellets* 4mL do tampão *RNAse-free water* (RNFW). Após uma nova centrifugação por 10 minutos a 4000 x g, desprezou-se os sobrenadantes novamente. Foram adicionados 300µL do tampão *Ressuspension Buffer 1* (BR1) e, após homogeneização, foram adicionados 300µL do tampão “Binding Buffer 2” (BR2) e 40µL da proteinase K (PK), seguido de incubação a 55°C por 10 minutos. Os lisados foram transferidos para as colunas de cor roxa (*Shredder spin column* – PSC; lilac) e os tubos foram centrifugados a 16.000 x g por 3 minutos. As colunas foram descartadas e 350µL de etanol absoluto foram adicionados. Os lisados foram transferidos para as colunas de cor rosa

(*RNA spin column* – PRC; red) em duas partes e centrifugados por 1 minuto a 10.000 x g. Foram adicionados 350µL do tampão *Wash Buffer 1* (BR3) em cada coluna, seguido de centrifugação por 1 minuto a 10.000 x g. Para a etapa de digestão do DNA, foram adicionados 10µL da enzima DNase I (RNFD) e 70µL de tampão de digestão *DNA Digestion Buffer* (RDD) em cada coluna, que foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente. Após este processo, 350µL do tampão *Wash Buffer 1* (BR3) foram adicionados e os tubos centrifugados por 1 minuto a 10.000 x g. Após adição de 500µL do tampão *Wash Buffer 2* (BR4), os tubos foram submetidos à centrifugação por 3 minutos a 10.000 x g. Em seguida, 500µL do tampão *Elution Buffer* (BR5) foram adicionados e os tubos centrifugados por 1 minuto a 10.000 x g por duas vezes, resultando em 100µL de RNA extraído. Após a extração todas as amostras de RNA foram quantificadas pelo método fluorimétrico do equipamento *QuBit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen, USA) rendendo, em média, 120 ng/µL, e sua integridade foi conferida pelo *Agilent® 2100 BioAnalyzer chip* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), seguindo os protocolos descritos pelo fabricante. Foram consideradas adequadas as amostras com razão de absorbância 260/280 nm próxima a 2,0 e integridade com RIN > 8 (*RNA Integrity Number*). Foi utilizado um RNA Universal como referência, que consiste em um *pool* de RNA de diversos tecidos obtido comercialmente (*Universal Human Reference RNA*, Agilent, cat. 740000), que permite a normalização das amostras, minimizando o viés na análise dos RNA independentemente do seu nível de expressão.

3.6 Análise da expressão diferencial dos genes da via de sinalização do NF- κ B

As amostras adequadas para a realização do estudo foram processadas para que o RNA fosse convertido em DNA complementar (cDNA), utilizando-se a enzima *ProtoScript II Reverse Transcriptase* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), de acordo com instruções do fabricante. O procedimento foi iniciado para síntese de cDNA, a partir de 50ng de RNA.

Para a avaliação da expressão gênica, foi utilizado o *Kit TruSeq Targeted RNA Custom panel* (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) com 118 genes ligados a via do NF- κ B e 12 genes endógenos (**Tabela 1**). O protocolo de preparação das bibliotecas das amostras que foram analisadas é constituído por 6 etapas: síntese do cDNA; hibridização do *pool* de oligos referentes a regiões alvo de interesse; etapas de lavagem para a remoção dos oligos que não se ligaram a região alvo e adição de adaptadores de identificação das amostras; amplificação da biblioteca; purificação com *beads* magnéticas; quantificação e denaturação do *pool* de amostras para a geração de *cluster*.

A clusterização (processo de amplificação isotérmica do cDNA em uma *flowcell*) e os sequenciamentos, foram realizados na plataforma Illumina® MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), pertencente a rede multiusuário do laboratório SELA-FMUSP.

Tabela 1. Genes relacionados com a via de sinalização NF- κ B analisados no painel de expressão do *Kit TruSeq Targeted RNA Custom Panel (Illumina, USA)* com os 12 genes endógenos.

<i>AKT1</i>	<i>CCL2</i>	<i>CSF1</i>	<i>GADD45B</i>	<i>IL1RN</i>	<i>MYC</i>	<i>REL</i>	<i>TICAM1</i>	<i>TNFSF10</i>
<i>ATF1</i>	<i>CCL22</i>	<i>CSF2</i>	<i>HMOX1</i>	<i>IL2</i>	<i>MYD88</i>	<i>RELA</i>	<i>TLR1</i>	<i>TNFSF14</i>
<i>BCL10</i>	<i>CCL5</i>	<i>CSF3</i>	<i>ICAM1</i>	<i>IL6</i>	<i>NFKB1</i>	<i>RELB</i>	<i>TLR2</i>	<i>TP53</i>
<i>BCL2L1</i>	<i>CCR5</i>	<i>CXCL1</i>	<i>IFNA1</i>	<i>IL8</i>	<i>NFKB2</i>	<i>RHOA</i>	<i>TLR3</i>	<i>TRADD</i>
<i>BCL3</i>	<i>CD27</i>	<i>CXCL10</i>	<i>IFNB1</i>	<i>IRAK1</i>	<i>NFKBIA</i>	<i>RIPK1</i>	<i>TLR6</i>	<i>TRAF2</i>
<i>BIRC2</i>	<i>CD40</i>	<i>CXCL2</i>	<i>IFNG</i>	<i>IRAK2</i>	<i>NFKBIB</i>	<i>SELE</i>	<i>TLR9</i>	<i>TRAF3</i>
<i>BIRC3</i>	<i>CD69</i>	<i>CXCL9</i>	<i>IKBKE</i>	<i>IRF1</i>	<i>NFKBIE</i>	<i>SELP</i>	<i>TNF</i>	<i>TRAF6</i>
<i>C3</i>	<i>CD80</i>	<i>EGFR</i>	<i>IKBKG</i>	<i>LTBR</i>	<i>NR4A2</i>	<i>SOD2</i>	<i>TNFAIP3</i>	<i>VCAM1</i>
<i>CARD11</i>	<i>CD83</i>	<i>EGR1</i>	<i>IL12B</i>	<i>MALT1</i>	<i>PDGFB</i>	<i>STAT1</i>	<i>TNFRSF10A</i>	<i>XIAP</i>
<i>CASP1</i>	<i>CDKN1A</i>	<i>ELK1</i>	<i>IL15</i>	<i>MAP2K6</i>	<i>PLAU</i>	<i>STAT3</i>	<i>TNFRSF10B</i>	<i>TLR4</i>
<i>CASP8</i>	<i>CFLAR</i>	<i>FASLG</i>	<i>IL1B</i>	<i>MAP3K1</i>	<i>PTGS2</i>	<i>STAT5B</i>	<i>TNFRSF1A</i>	<i>IL10</i>
<i>CCL11</i>	<i>CHUK</i>	<i>FOS</i>	<i>IL1R1</i>	<i>MMP9</i>	<i>RAF1</i>	<i>TBK1</i>	<i>TNFRSF1B</i>	<i>PYCARD</i>
<i>TREM1</i>	<i>IL27</i>	<i>IL18</i>	<i>MBL2</i>	<i>CX3CL1</i>	<i>HAMP</i>	<i>ESM1</i>	<i>CD64</i>	<i>FOXP3</i>
<i>IL33</i>	<i>ALB</i>	<i>ACTB</i>	<i>GAPDH</i>	<i>ALDOA</i>	<i>HMBS</i>	<i>ARHGDI1A</i>	<i>HPRT1</i>	<i>IPO8</i>
<i>PGK1</i>	<i>RPL11</i>	<i>RPL19</i>	<i>RPL32</i>					

Em cinza estão os genes endógenos.

3.6.1 Controle de Qualidade e Mapeamento

A análise dos dados foi conduzida por um bioinformata da empresa DUNA Bioinformatics. Na etapa de obtenção e análise dos dados brutos, foi utilizado os softwares *FastQC* e *MultiQC* (Ewels et al., 2016), para o controle de qualidade. Foi observado uma boa qualidade dos dados sequenciados, tendo sido removida ou cortada uma pequena quantidade de *reads*, devido a poucos adaptadores identificados e/ou sequências muito curtas.

Os *softwares* geram um relatório sobre os scores de qualidade dos dados, observando algumas características como: tamanho dos *reads*, qualidade das bases, %CG, número de *reads* duplicados e adaptadores. Para o procedimento de triagem dos *reads* foi utilizada a ferramenta *Cutadapt* (Martin, 2011). O

mapeamento e alinhamento das amostras foram feitos contra o genoma referência de *Homo sapiens* (*Genome Reference Consortium GRCh38 build, dez/2013*) utilizando o programa *STAR* (Dobin et al., 2013). A contagem dos *reads* alinhados foi realizada com o software *htseq-count*.

3.6.2 Alinhamento e Anotação dos *Reads*

Os *reads* foram alinhados e anotados no genoma humano GRCh38 utilizando o alinhador *STAR* (Dobin et al., 2013) com as configurações padrão. A anotação dos *reads* foi realizada pelo *STAR*, utilizando o GTF na versão (GCF_000001405.39_GRCh38.p13), obtido do NCBI. Por fim, foi utilizada a ferramenta *htseq-count* para a contabilização dos *reads*.

3.6.3 Expressão Diferencial

Para a análise de expressão diferencial foi utilizado o programa *DESeq2* (Love et al., 2014), baseado em linguagem R. Neste tipo de análise, identificam-se genes que mudaram seus níveis de expressão em diferentes condições biológicas. No estudo, as condições biológicas utilizadas para a comparação foram pacientes com sepse neonatal tardia causada por bactérias gram-positivas, Gram-negativas ou sepse clínica versus controles; comparação entre os dias 0, 3 e 7 pós-diagnóstico dentro de cada grupo e comparação dos pacientes que foram à óbito versus os pacientes que tiveram alta hospitalar. Este programa faz uso de modelos lineares generalizados binomial negativos e utiliza a contagem dos *reads* para normalizar o valor de expressão e calcular a expressão diferencial entre os grupos. Foram definidos como sendo

diferencialmente expressos os genes com valor de $p \leq 0,05$, separando os genes em duas categorias, hipoexpressos e hiperexpressos, de acordo com o valor do $\text{Log}_2 \text{Fold Change}$ (FC).

3.6.4 Análise funcional e de enriquecimento

Os genes considerados diferencialmente expressos foram submetidos a uma análise de enriquecimento funcional baseada em ontologia gênica, a qual investiga uma lista de genes pertencentes a uma determinada categoria de ontologia possibilitando a identificação de processos biológicos significativos. As análises de Ontologia (*Gene Ontology Resource*) e de vias funcionais (*KEGG*, *REACTOME*) foram realizadas utilizando-se estatística hipergeométrica para analisar o enriquecimento de uma lista de genes (Yu et al., 2012), através da linguagem R “*ClusterProfiler*”, tendo sido utilizada a lista dos genes hipoexpressos e hiperexpressos separadamente. Foram elegíveis como enriquecidas, as ontologias ou vias com valor mais significativo com base no p ajustado $\leq 0,05$ e maior número de *counts*.

Abaixo segue na **Figura 3**, o diagrama do pipeline, ou seja, o fluxograma de análise dos dados obtidos do sequenciamento.

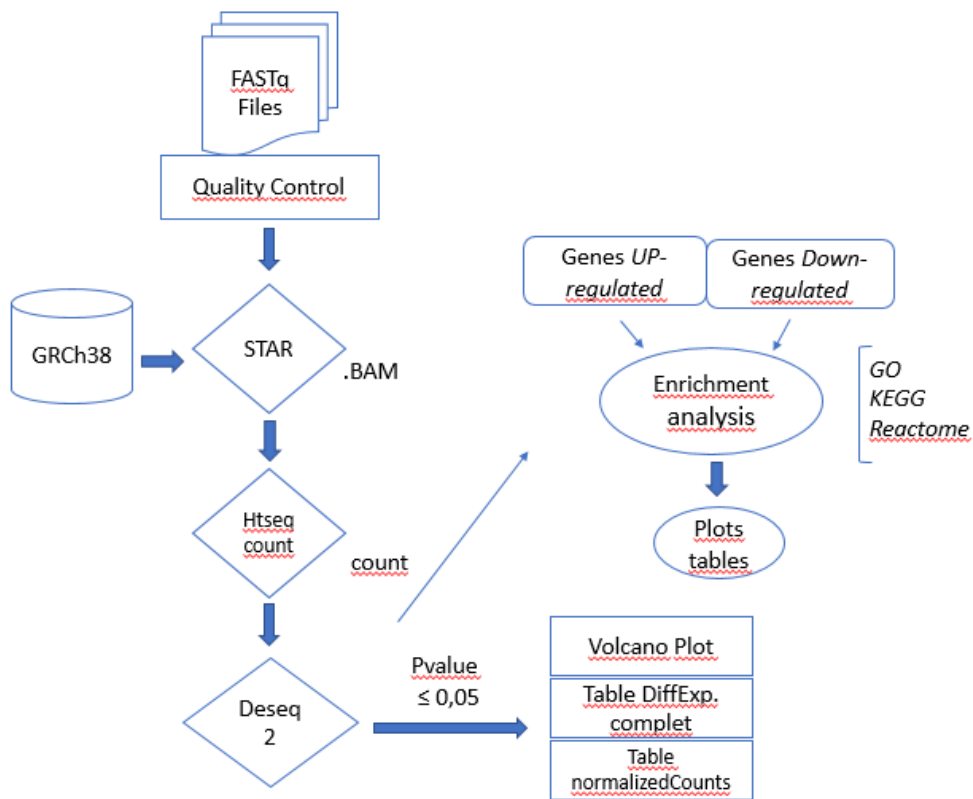


Figura 3. Diagrama do pipeline.

3.7 Validação da expressão dos genes *MBL2*, *MMP9* e *TREM1* por ensaio imunoenzimático (ELISA)

A validação da expressão dos genes *MBL2*, *MMP9* e *TREM1* foi realizada por meio da técnica de ELISA. As proteínas MBL (Lectina de ligação à manose), MMP-9 (Metalopeptidase 9 da matriz) e TREM-1 (Receptor de ativação expresso em células mieloides-1) solúveis foram quantificadas utilizando-se os kits *Human DuoSet ELISA*, da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), segundo as instruções do fabricante.

3.8 Análise Estatística

Para síntese dos dados clínicos e dosagens das citocinas e proteínas por CBA e ELISA, respectivamente, foi inicialmente realizada uma análise descritiva, por meio do cálculo de médias, medianas, desvios padrão e intervalos de confiança. Para verificar a normalidade dos dados, foi utilizado o teste de *D'Agostino-Pearson*. O teste *t de Student* foi utilizado como teste paramétrico e o teste *U de Mann Whitney* como teste não paramétrico, quando apropriado. O teste *t* pareado ou o teste de *Wilcoxon* foi utilizado, de acordo com a normalidade dos dados, para comparar os diferentes tempos de coleta dentro de cada grupo. O teste de correlação de *Spearman* foi utilizado para determinar a associação linear entre as variáveis. Todos os testes estatísticos foram realizados considerando um limite de confiança de 95% e nível de significância $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Análise do grupo amostral

A casuística do presente estudo foi composta por 32 casos de RN com sepse (21 com sepse comprovada e 11 com sepse clínica) e 21 RN controle, cujas características clínicas, demográficas, parâmetros hematológicos e laboratoriais avaliados se encontram na **Tabela 2**.

Em todos os casos, foram coletadas três amostras seriadas, nos dias 0, 3 e 7 pós-diagnóstico, com exceção do caso 8, em que foram colhidas apenas duas amostras (dias 0 e 3), pois o paciente foi a óbito no dia 4 pós-diagnóstico.

Na **Tabela 2**, estão demonstrados números elevados de neutrófilos imaturos nos grupos de sepse por Gram-negativo e no grupo de sepse clínica em relação aos controles e, conseqüentemente o mesmo foi observado para o índice neutrofílico (proporção de neutrófilos imaturos sobre o total de neutrófilos). A proteína C-reativa foi significativamente maior nos três grupos de RN com sepse em relação aos controles.

Foram encontradas diferenças entre os grupos de sepse, significante somente no grupo Gram-negativo, e controles nas idades do dia do diagnóstico.

Tabela 2. Principais dados demográficos, clínicos e hematológicos dos RN com sepse comprovada e sepse clínica e dos RN do grupo controle

	Neonatos com sepse (n=32)			Controle (n=21)
	Gram + (n=12)	Gram - (n=9)	Clínica (n=11)	
Sexo, M/F, n	6/6	8/1	7/4	12/9
Parto, Cesárea/vaginal, n	9/3	6/3	7/4	12/9
Idade gestacional, semanas, M (± DP)	37 ² / ₇ (± 0)	35 ⁵ / ₇ (± 2 ³ / ₇)	37 ⁵ / ₇ (± 2)	37 ¹ / ₇ (± 2 ³ / ₇)
Peso nasc., g, M (±DP)	2472 (± 572)	2628 (± 666)	2735 (± 531)	2765 (± 630)
Idade no dia 0, dias, Med (IC 95%)	15 (11-23)	20 (15-25) ^a	15 (6-26)	8 (7-15)
Peso no dia 0, g, M (±DP)	2795 (±562)	2842 (±682)	2881 (±430)	2819 (±542)
Suporte respiratório*, n (%)	4 (33,3%)	8 (88,9%)	5 (45,5%)	-
Duração da ventilação, dias, Med (IC 95%)	19 (7-32)	8 (2-20)	8 (3-19)	-
Choque séptico**, n (%)	4 (33,3)	6 (66,7)	5 (45,5)	
Leucócitos totais, 10 ³ /uL, Med (IC 95%)	15,5 (10,1-22,3)	9,2 (4,9-13,0) ^b	18,1 (13,3-23,3)	12,4 (6,8-36,7)
Neutrófilos totais, 10 ³ /uL, Med (IC 95%)	8,4 (5,6-14,6)	5,3 (3,1-8,9)	12,4 (7,4-15,9)	5,9 (5-9,5)
Neutrófilos imaturos, /uL, Med (IC 95%)	240 (76-959)	340 (95-854) ^a	410 (0-4461) ^c	0 (0-164)
Índice neutrofílico, Med (IC 95%)	0,033 (0-0,14)	0,081 (0,01-0,18) ^a	0,058 (0,03-0,13) ^a	0 (0,0002-0,001)
Plaquetas, x 10 ³ /uL, M (±DP)	366 (±163)	251 (±147)	321 (±202)	363 (±140)
PCR, mg/L, Med (IC 95%)	19,5 (8,5-54,1) ^c	69,4 (14,3-136,1) ^d	33,4 (14-85,9) ^e	1,1 (0,9-2,1)
Bilirrub. direta, mg/dL, Med (IC 95%)	0,88 (0,27-1,3)	0,4 (0,17-1,3)	0,64 (0,5-1,3)	0,43 (0,2-1)
Lactato, mg/dL, Med (IC 95%)	18 (12,6-29,2)	16 (3,6-38,4)	17,5 (12,1-31,5)	19 (14,3-23,1)
Óbito, n (%)	1 (8,3%)	1 (11,1%)	2 (18,2%)	-

n: número; M: masculino; F: feminino; Med: mediana; IC: intervalo de confiança; M: média; DP: desvio padrão; g: gramas; - sem ocorrência; ^a ($p < 0,05$ em relação ao controle); ^b ($p < 0,05$ em relação ao grupo de sepse clínica); ^c ($p < 0,01$ em relação ao controle); ^d ($p < 0,001$ em relação ao controle); ^e ($p < 0,0001$ em relação ao controle); *Suporte respiratório foi definido por ventilação mecânica e/ou CPAP; **Choque séptico definido como sepse na presença de disfunção cardiovascular, ou seja, hipotensão e necessidade de drogas vasoativas, com ou sem a administração de fluido intravenoso.

Na **Tabela 3**, descrevemos os agentes etiológicos isolados em cultura de líquidos estéreis dos 21 RN com sepse comprovada (12 com sepse por Gram-positivo e 9 com sepse por Gram-negativo).

Tabela 3. Resultados de culturas de líquidos estéreis dos RN diagnosticados com sepse comprovada

	n
Sepse por Gram-negativos	9
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	3
<i>Pseudomonas aeruginosa multisensível</i>	1
<i>Stenotrophomonas maltrophila</i>	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	1
Sepse por Gram-positivos	13
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	3
<i>Staphylococcus hominis</i>	1
<i>Staphylococcus haemoliticus</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	1
<i>Micrococcus sp</i>	1

Foram isoladas 7 espécies distintas de bactérias nos 9 RN com sepse por Gram-negativos, prevalecendo a espécie *Enterobacter cloacae complex* em 3 dos casos. Nos 12 casos de sepse por Gram-positivos, foram isoladas 13 espécies, pois no caso 7, foram detectadas duas espécies distintas de bactérias Gram-positivas. Nesse grupo, prevaleceu 6 isolamentos de *Staphylococcus epidermidis*.

Em muitos casos, na cultura de líquidos estéreis, como a hemocultura ou urocultura não é possível isolar o agente etiológico, mas de acordo com os sinais clínicos e os exames laboratoriais, o RN é diagnosticado com sepse

clínica. Neste caso, identificamos 11 RN com sepse clínica, ou seja, uma positividade da cultura em líquidos estéreis de 65,6% dos casos.

O risco infeccioso foi determinado como diagnóstico inicial, o que justificou a internação ou foi adquirido durante a permanência no setor. Dentre os pacientes com sepse, todos apresentaram pelo menos 2 critérios clínicos e 2 critérios laboratoriais compatíveis com quadro infeccioso, descritos anteriormente na casuística. As alterações clínicas mais frequentes foram as respiratórias, caracterizadas por apneia e taquipneia e as alterações hematológicas (Tabela 2 e Figura 4).

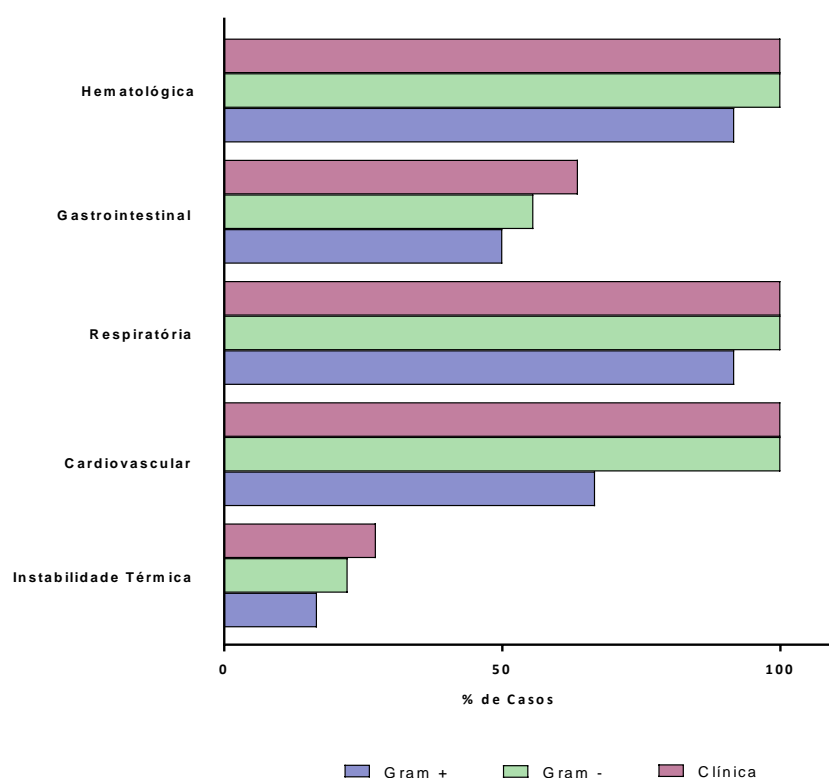


Figura 4. Porcentagem de RN dos grupos de sepse causada por bactérias Gram-positivas (Gram +), por bactérias Gram-negativas (Gram -) e sepse clínica no dia do diagnóstico com alterações em cada sistema, segundo os critérios de Goldstein et al. (2005).

Dos 32 pacientes com sepse, 15 casos tiveram choque séptico, sendo 11 casos no dia 0 e quatro casos no dia 3 pós-diagnóstico. Vinte e oito pacientes tiveram alta hospitalar e quatro pacientes foram a óbito, um do grupo com sepse por bactéria Gram-negativa (*Klebsiella oxytoca*), outro do grupo com sepse por bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e dois pacientes do grupo sepse clínica.

4.2. Citocinas séricas

As citocinas foram avaliadas nas amostras de soro dos pacientes com sepse comprovada, sepse clínica e nos controles por citometria de fluxo. Os resultados das dosagens estão demonstrados na **Tabela 4**. Como podemos observar, os resultados mostram concentrações significativamente mais altas de IL-6 e IL-8 nos RN com sepse por bactérias Gram-negativas em relação aos controles.

Tabela 4. Concentrações séricas de citocinas dosadas por citometria de fluxo nas amostras de soro dos RN com sepse causada por bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas e com sepse clínica no dia do diagnóstico (0), 3 e 7 pós-diagnóstico e dos RN controle.

	Citocinas (pg/mL)					
	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12	TNF- α
	Gram-positivo					
Dia 0	0,94 (0-20,1)	13,7 (0,6-5000)	52,6 (13,1-890,8)	3,3 (0-90,9)	0,04 (0-1,9)	0,2 (0-16,7)
Dia 3	0,3 (0-14,6)	4,9 (0,4-164,8)	63,2 (10,4-1166)	1,0 (0,1-7,2)	0 (0-0,9)	0,3 (0-13,1)
Dia 7	0,6 (0-8,8)	2,5 (0,6-177,6)	59,7 (10,1-520,9)	1,9 (0,5-12,1)	1,0 (0-8,4)	0,3 (0-6,6)
	Gram-negativo					
Dia 0	0,9 (0-11,7)	977,7 *** (6,7-5000)	212,7 * (32,7-5000)	22,9 (1,2-5000)	0,5 (0,05-1,9)	0,8 (0-2,5)
Dia 3	0,6 (0-5,1)	30,3 (2,8-5000)	122,4 (32,1-5000)	2,7 (0,7-641,5)	0,25 (0-1,5)	0,6 (0-5,0)
Dia 7	1,5 (0-73,1)	10,1 (0,6-463,7)	112,2 (25,2-1962)	1,9 (1,3-25,9)	3,9 (0-28,4)	1,3 (0-55,1)
	Sepse Clínica					
Dia 0	0,9 (0-77,5)	26,4 (3,5-896,5)	84,7 (14,5-1420)	1,4 (0,3-51,1)	0,4 (0-61,2)	0,4 (0-46,4)
Dia 3	1,2 (0-243,4)	11,7 (1,7-132,1)	31,5 (10,1-308,9)	1,5 (0-133,4)	0,2 (0-194,2)	0,3 (0-172,8)
Dia 7	1,2 (0-218,7)	35,0 (0,5-530,2)	36,5 (9,3-1426)	3,1 (0,1-109,3)	0,5 (0-149,1)	0,8 (0-170,3)
	Controle					
	1,0 (0-9,7)	4,7 (1,2-14,3)	39,2 (14,9-89,3)	1,9 (0,2-8,8)	0,6 (0-9,5)	0,5 (0-7,4)

Valores expressos em mediana (min-max); *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ em relação ao controle.

4.3. Análise da Expressão Gênica Diferencial do Painel Customizado pela Metodologia RNASeq

A análise de expressão dos genes ligados à via do NF- κ B que compõem o painel customizado é mostrada, a seguir, na **Tabela 5**. A análise comparativa de expressão gênica foi realizada entre os grupos de sepse, comprovada ou clínica, vs. controles e entre os três dias de coleta dentro de cada grupo, indicando o número total de genes diferencialmente expressos (DEG - do inglês *Differential Expressed Genes*), classificados em genes hiperexpressos (*UP*) e hipoexpressos (*DOWN*) para cada grupo de comparação.

Tabela 5. Número de genes diferencialmente expressos em cada grupo de comparação.

Grupos	DEG	Genes UP	Genes DOWN
Gram positivo vs. Controles	11	4	7
Gram positivo Dia 0 vs. Dia 3	7	2	5
Gram positivo Dia 3 vs. Dia 7	8	4	4
Gram positivo Dia 0 vs. Dia 7	16	3	13
Gram negativo vs. Controles	22	5	17
Gram negativo Dia 0 vs. Dia 3	4	1	3
Gram negativo Dia 3 vs. Dia 7	5	5	0
Gram negativo Dia 0 vs. Dia 7	3	2	1
Sepse clínica vs. Controles	12	1	11
Sepse clínica Dia 0 vs. Dia 3	2	2	0
Sepse clínica Dia 3 vs. Dia 7	3	1	2
Sepse clínica Dia 0 vs. Dia 7	2	1	1

DEG: número total de genes diferencialmente expressos; *UP*: gene hiperexpresso; *DOWN*: gene hipoexpresso.

Os genes hipo e hiperexpressos encontrados foram submetidos à análise de enriquecimento funcional, onde foi possível observar seu envolvimento com importantes processos biológicos, funções moleculares, componentes celulares e vias metabólicas, conforme descrito nos próximos itens. Podemos notar que o grupo de sepse por bactérias Gram-negativas apresentou o maior número de DEG em relação aos controles, em sua maioria hipoexpressos, resultados também observados nos outros grupos. Já a análise comparativa dos dias de coleta dentro de cada grupo revelou maior número de DEG no dia 0 no grupo de sepse por Gram-positivos em relação ao dia 7; um número de DEG mais homogeneamente distribuído entre os dias de coleta no grupo de sepse por

Gram-negativos e o grupo de sepse clínica apresentou um número notadamente menor de DEG entre os dias de coleta.

4.3.1 Sepse por Gram-positivos vs. Controles

Na análise de expressão diferencial foram identificados 11 genes diferencialmente expressos no grupo de sepse por bactérias Gram-positivas nos dias 0, 3 e 7 em relação ao grupo controle, dos quais quatro genes estavam hiperexpressos e sete genes hipoexpressos, considerando $p \leq 0,05$, como podemos verificar na **Tabela 6**.

Tabela 6. Identificação e valor de expressão (FC) dos genes diferencialmente expressos no grupo de RN com sepse por bactérias Gram-positivas vs. controles.

Símbolo	Nome do Gene	FC	Valor p
UP			
MBL2	<i>Mannose Binding Lectin 2</i>	4,35	0,01
IL1B	<i>Interleukin 1 Beta</i>	2,32	0,001
MMP9	<i>Matrix Metalloproteinase 9</i>	2,13	0,002
FASLG	<i>Fas Ligand</i>	1,64	0,04
DOWN			
HAMP	<i>Hepcidin Antimicrobial Peptide</i>	-5,71	0,04
CXCL2	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 2</i>	-2,97	0,001
CXCL8	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 8</i>	-2,72	0,003
CD83	<i>CD83 Molecule</i>	-2,3	0,02
TNFSF14	<i>TNF Superfamily Member 14</i>	-1,66	0,008
EGR1	<i>Early Growth Response 1</i>	-1,56	0,01
LTBR	<i>Lymphotoxin Beta Receptor</i>	-1,19	0,02

FC: Log₂ Fold Change; UP: gene hiperexpresso; DOWN: gene hipoexpresso.

Na **Figura 5**, os resultados da expressão diferencial dos genes estão representados no gráfico do tipo *Volcano plot*, utilizado para sumarizar e

visualizar esses resultados. Esse *plot* possibilita integrar os valores de *Fold Change* e significância estatística, evidenciando quais foram os genes que tiveram sua expressão afetada no grupo de RN com sepse por Gram-positivos em relação aos controles.

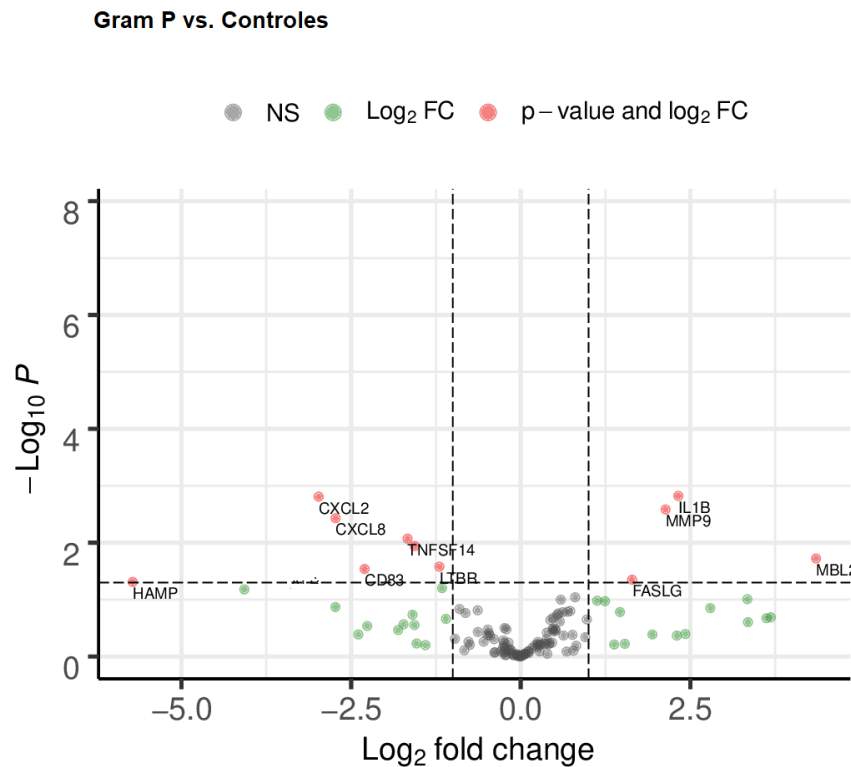


Figura 5. Volcano plot representando o *Fold Change* (eixo x) versus a significância (eixo y) dos genes hipoexpressos e hiperexpressos nos RN com sepse por bactérias Gram-positivas, em todos os dias de coleta. Os pontos em vermelho representam os genes com expressão diferencial significativa. Os pontos em verde correspondem aos genes diferencialmente expressos, porém sem significância estatística e em cinza, genes não alterados (NS).

Foram designados os termos de ontologia gênica (do inglês, *Gene Ontology term - GO term*) aos 11 genes diferencialmente expressos. Os 15 termos GO significativamente enriquecidos ($p \leq 0,05$) foram associados a genes

envolvidos principalmente com a resposta de citocinas e quimiocinas, apoptose e matriz extracelular contendo colágeno (**Tabela 7**).

Tabela 7. Análises de enriquecimento das ontologias gênicas (GO) nos genes hiper e hipoexpressos do grupo de RN com sepse causada por bactérias Gram-positivas.

	ID GO ¹	Descrição ²	Classe GO ³
UP	GO:2001234	<i>Negative regulation of apoptotic signaling pathway</i>	P
	GO:2001233	<i>Regulation of apoptotic signaling pathway</i>	P
	GO:0005125	<i>Cytokine activity</i>	F
	GO:0005126	<i>Cytokine receptor binding</i>	F
	GO:0048018	<i>Receptor ligand activity</i>	F
	GO:0062023	<i>Collagen-containing extracellular matrix</i>	C
DOWN	GO:0071356	<i>Cellular response to tumor necrosis factor</i>	P
	GO:0034612	<i>Response to tumor necrosis factor</i>	P
	GO:0071214	<i>Cellular response to abiotic stimulus</i>	P
	GO:0104004	<i>Cellular response to environmental stimulus</i>	P
	GO:0005125	<i>Cytokine activity</i>	F
	GO:0005126	<i>Cytokine receptor binding</i>	F
	GO:0048018	<i>Receptor ligand activity</i>	F
	GO:0008009	<i>Chemokine activity</i>	F
GO:0042379	<i>Chemokine receptor binding</i>	F	

UP: gene hiperexpresso; *DOWN*: gene hipoexpresso; ¹Identificador do termo de ontologia gênica; ²Descrição do termo de ontologia gênica; ³Categoria na qual são classificados os termos de ontologia gênica. P: processo biológico, F: função molecular, C: componente celular.

Expandindo a análise ontológica dos genes hiperexpressos, observamos por meio do banco de dados *KEGG*, vias metabólicas envolvidas com doença do enxerto versus hospedeiro, Diabetes tipo I, Tripanossomíase africana, via de sinalização da interleucina 17 e doença de Chagas. Para os genes hipoexpressos, a análise detectou vias metabólicas envolvidas com receptores de citocinas, interação de proteínas virais com citocinas, via de sinalização do *NF-κB* e interação de receptores de citocinas. O banco de dados *REACTOME* demonstrou, nos genes hiperexpressos, vias de sinalização de interleucinas e de interleucina 4 e 13, e nos genes hipoexpressos, vias ligadas aos membros

da superfamília de receptores de TNF mediados pela via não canônica de NF- κ B, sinalização de interleucina 10 e receptores de ligação a quimiocinas.

4.3.2 Sepsis por Gram-negativos vs. Controles

A análise identificou 22 genes diferencialmente expressos no grupo de sepsis causada por bactérias Gram-negativas nos dias 0, 3 e 7 em relação às amostras controle, dos quais cinco genes hiperexpressos e 17 genes hipoexpressos, considerando $p \leq 0,05$, como podemos verificar na **Tabela 8**.

Tabela 8. Identificação e valor de expressão (FC) dos genes diferencialmente expressos no grupo de RN com sepsis por bactérias Gram-negativas vs. controles.

Símbolo do Gene	Nome do Gene	FC	Valor p
UP			
<i>IFNB1</i>	<i>Interferon Beta 1</i>	6,95	0,0008
<i>CCL22</i>	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 22</i>	4,89	0,02
<i>MBL2</i>	<i>Mannose Binding Lectin 2</i>	4,55	0,009
<i>MMP9</i>	<i>Matrix Metalloproteinase 9</i>	2,51	0,0001
<i>CCR5</i>	<i>C-C Motif Chemokine Receptor 5</i>	2,07	0,02
DOWN			
<i>CXCL2</i>	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 2</i>	-3,13	0,001
<i>EGR1</i>	<i>Early Growth Response 1</i>	-2,14	0,001
<i>MYC</i>	<i>MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor</i>	-1,8	0,003
<i>IRAK1</i>	<i>Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 1</i>	-1,8	0,02
<i>TNFRSF10B</i>	<i>TNF Receptor Superfamily Member 10b</i>	-1,69	0,01
<i>NFKBIE</i>	<i>NFKB Inhibitor Epsilon</i>	-1,55	0,009
<i>TRAF3</i>	<i>TNF Receptor Associated Factor 3</i>	-1,49	0,01
<i>FOS</i>	<i>Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i>	-1,35	0,007
<i>CDKN1A</i>	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1^a</i>	-1,32	0,01
<i>BIRC3</i>	<i>Baculoviral IAP Repeat Containing 3</i>	-1,25	0,01
<i>TBK1</i>	<i>TANK Binding Kinase 1</i>	-1,24	0,04
<i>CASP8</i>	<i>Caspase 8</i>	-1,23	0,008
<i>TP53</i>	<i>Tumor Protein P53</i>	-1,14	0,02
<i>LTBR</i>	<i>Lymphotoxin Beta Receptor</i>	-1,13	0,03
<i>BIRC2</i>	<i>Baculoviral IAP Repeat Containing 2</i>	-1,08	0,02
<i>RHOA</i>	<i>Ras Homolog Family Member A</i>	-1,03	0,01
<i>IRF1</i>	<i>Interferon Regulatory Factor 1</i>	-0,94	0,04

FC: Log₂ Fold Change; UP: gene hiperexpresso; DOWN: gene hipoexpresso.

Os resultados dos genes diferencialmente expressos nos RN com sepse por bactérias Gram-negativas em relação aos controles estão representados no gráfico *Volcano plot* (**Figura 6**). Destaca-se nesta análise novamente a hiperexpressão dos genes *MBL2* e *MMP9*, assim como identificado no grupo de RN com sepse por bactérias Gram-positivas.

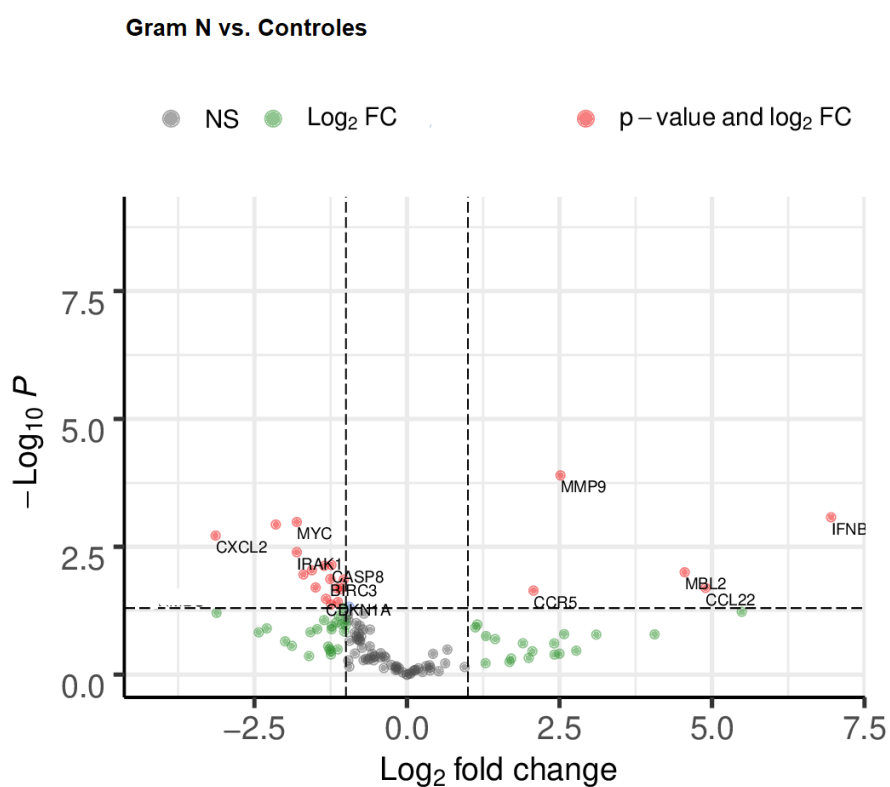


Figura 6. *Volcano plot* representando o *Fold Change* (eixo x) versus a significância (eixo y) dos genes hipoexpressos e hiperexpressos nos RN com sepse por bactérias Gram-negativas, em todos os dias de coleta. Os pontos em vermelho representam os genes com expressão diferencial significativa. Os pontos em verde correspondem aos genes diferencialmente expressos, porém sem significância estatística e em cinza, genes não alterados (NS).

Foram designados os termos de ontologia gênica aos 22 genes diferencialmente expressos. Nos 19 termos GO é possível observar que as vias

enriquecidas para genes hiperexpressos foram associadas a genes envolvidos, principalmente, com a resposta de citocinas e quimiocinas e lúmen do grânulo terciário e para aquelas relativas aos genes hipoexpressos foram associadas à via de sinalização do NF- κ B (**Tabela 9**).

Tabela 9. Análises de enriquecimento das ontologias gênicas (GO) nos DEG do grupo de RN com sepse causada por bactérias Gram-negativas.

	ID GO ¹	Descrição ²	Classe GO ³
UP	GO:0070098	<i>Chemokine-mediated signaling pathway</i>	P
	GO:1990868	<i>Response to chemokine</i>	P
	GO:1990869	<i>Cellular response to chemokine</i>	P
	GO:0048525	<i>Negative regulation of viral process</i>	P
	GO:0005125	<i>Cytokine activity</i>	F
	GO:0005126	<i>Cytokine receptor binding</i>	F
	GO:0048018	<i>Receptor ligand activity</i>	F
	GO:0062023	<i>Collagen-containing extracellular matrix</i>	C
	GO:1904724	<i>Tertiary granule lumen</i>	C
DOWN	GO:0043123	<i>Positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling</i>	P
	GO:0043122	<i>Regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling</i>	P
	GO:0007249	<i>I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling cellular</i>	P
	GO:0071214	<i>Response to abiotic stimulus</i>	P
	GO:0104004	<i>Cellular response to environmental stimulus</i>	P
	GO:0031625	<i>Ubiquitin protein ligase binding</i>	F
	GO:0044389	<i>Ubiquitin-like protein ligase binding</i>	F
	GO:0001228	<i>DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific</i>	F
	GO:0009898	<i>Cytoplasmic side of plasma membrane</i>	C
GO:0098562	<i>Cytoplasmic side of membrane</i>	C	

UP: gene hiperexpresso; *DOWN*: gene hipoexpresso; ¹Identificador do termo de ontologia gênica; ²Descrição do termo de ontologia gênica; ³Categoria na qual são classificados os termos de ontologia gênica. P: processo biológico, F: função molecular, C: componente celular.

De acordo com o *KEGG*, que os genes hiperexpressos representam vias metabólicas ligadas à interação de receptores de citocinas, interação da proteína viral com receptores de citocinas e via de sinalização de TNF; e os hipoexpressos representam vias ligadas a infecção por *Salmonella*, infecção

pelo vírus *Epstein-Barr*, Sarcoma de *Kaposi*, infecções pelo vírus *Herpes*, via de sinalização TNF e Hepatite B. Pelo banco de dados *REACTOME*, os genes hiperexpressos são relacionados à sinalização por interleucinas, sinalização das interleucinas 4, 10 e 13 e receptores ligantes de quimiocinas; e os hipoexpressos estão envolvidos na cascata dos receptores *Toll-Like*, especificamente, TLR-3 e TLR-4, cascata do receptor TLR-4 independente de *MYD88* e *TRIF-TICAM1*, sinalização por interleucinas e apoptose.

4.3.3 Sepses clínica vs. Controles

Na análise de expressão diferencial foram identificados 12 genes DEG dos casos de sepses clínica nos dias 0, 3 e 7 em relação ao grupo controle: apenas um gene hiperexpresso e 11 genes hipoexpressos, considerando $p \leq 0,05$, como podemos verificar na **Tabela 10**.

Tabela 10. Identificação e valor de expressão (FC) dos genes diferencialmente expressos no grupo de RN com sepse clínica vs. controles.

Símbolo do Gene	Nome do Gene	FC	Valor p
UP			
MMP9	<i>Matrix Metalloproteinase 9</i>	1,72	0,007
DOWN			
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	-12,43	0,001
CCL2	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 2</i>	-9,31	0,009
VCAM1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>	-8,42	0,0003
C3	<i>Complement C3</i>	-4,84	0,008
ESM1	<i>Endothelial Cell Specific Molecule 1</i>	-4,54	0,01
CXCL2	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 2</i>	-4,16	0,0001
EGR1	<i>Early Growth Response 1</i>	-1,99	0,002
ICAM1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>	-1,60	0,02
LTBR	<i>Lymphotoxin Beta Receptor</i>	-1,59	0,002
ATF1	<i>Activating Transcription Factor</i>	-1,41	0,02
IRAK1	<i>Interleukin 1 Receptor Associated Kinase</i>	-1,34	0,02

FC: Log₂ Fold Change; UP: gene hiperexpresso; DOWN: gene hipoexpresso.

A seguir, na **Figura 7**, os resultados dos genes diferencialmente expressos do grupo de RN com sepse clínica em relação aos controles estão representados no gráfico *Volcano plot*. Destaca-se o maior número de genes hipoexpressos, entre eles o *CXCL2*, também hipoexpresso nos grupos de sepse causada por bactérias Gram-positivas e negativas e o *ESM1*, hipoexpresso somente neste grupo. O único gene hiperexpresso, o *MMP9*, também foi evidenciado nos dois grupos de sepse comprovada.

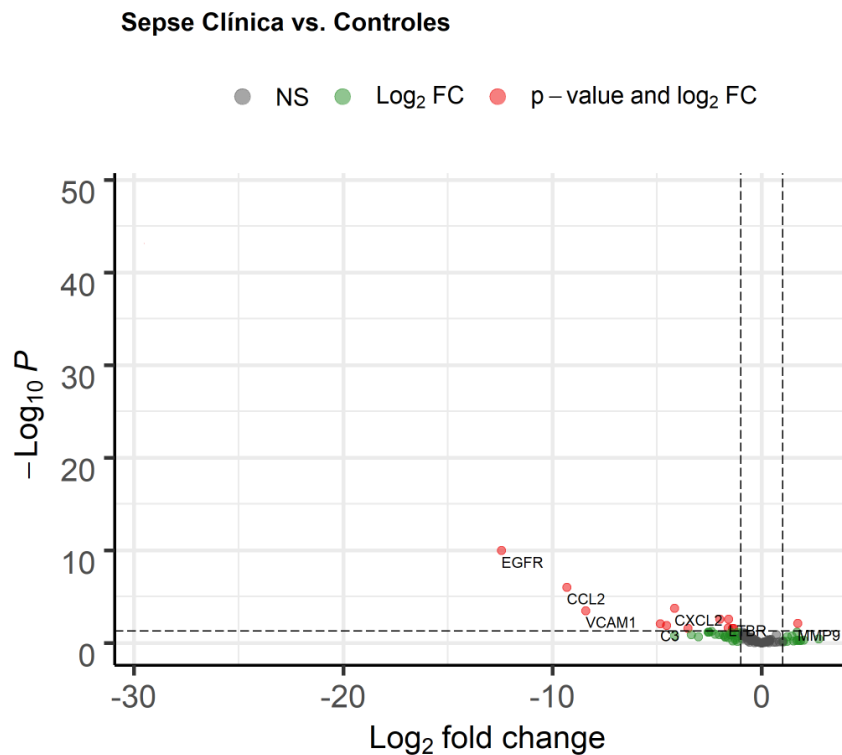


Figura 7. *Volcano plot* representando o *Fold Change* (eixo x) versus a significância (eixo y) dos genes hipoexpressos e hiperexpressos nos RN com sepse clínica, em todos os dias de coleta. Os pontos em vermelho representam os genes com expressão diferencial significativa. Os pontos em verde correspondem aos genes diferencialmente expressos, porém sem significância estatística e em cinza, genes não alterados (NS).

Foram designados os termos de ontologia gênica para os 12 genes diferencialmente expressos. Nos 16 termos *GO* significativamente enriquecidos ($p \leq 0,05$) é possível observar que as vias enriquecidas para o gene hiperexpresso, *MMP9*, estão associadas ao lúmen do grânulo terciário, regulação da migração de queratinócitos, ligação a colágeno, atividade de metaloenzimas, enzimas do tipo serina e de metaloprotease; já as vias relativas aos genes hipoexpressos foram associadas à resposta celular a estímulos externos, resposta à molécula de origem bacteriana e

lipopolissacarídeo e ligação à molécula de adesão celular e integrinas (**Tabela 11**).

Tabela 11. Análises de enriquecimento das ontologias gênicas (GO) nos DEG do grupo de RN com sepse clínica.

	ID GO ¹	Descrição ²	Classe GO ³
UP	GO:1900122	<i>Positive regulation of receptor binding</i>	P
	GO:0051549	<i>Positive regulation of keratinocyte migration</i>	P
	GO:0051547	<i>Regulation of keratinocyte migration</i>	P
	GO:0005518	<i>Collagen binding</i>	F
	GO:0004222	<i>Metalloendopeptidase activity</i>	F
	GO:0004252	<i>Serine-type endopeptidase activity</i>	F
	GO:0008237	<i>Metalloproteinase activity</i>	F
	GO:1904724	<i>Tertiary granule lumen</i>	C
	GO:1904813	<i>Ficolin-1-rich granule lumen</i>	C
	GO:0070820	<i>Tertiary granule</i>	C
	GO:0101002	<i>Ficolin-1-rich granule</i>	C
DOWN	GO:0032496	<i>Response to lipopolysaccharide</i>	P
	GO:0071496	<i>Cellular response to external stimulus</i>	P
	GO:0002237	<i>Response to molecule of bacterial origin</i>	P
	GO:0005178	<i>Integrin binding</i>	F
	GO:0050839	<i>Cell adhesion molecule binding</i>	F

UP: gene hiperexpresso; *DOWN*: gene hipoexpresso; ¹Identificador do termo de ontologia gênica; ²Descrição do termo de ontologia gênica; ³Categoria na qual são classificados os termos de ontologia gênica. P: processo biológico, F: função molecular, C: componente celular.

De acordo com o *KEGG*, o gene hiperexpresso *MMP9* representa vias metabólicas ligadas à via de sinalização da interleucina 17, de TNF e resistência endócrina. Os genes hipoexpressos encontram-se em vias ligadas a via de sinalização do NF- κ B, via de sinalização AGE-RAGE e via de sinalização de TNF. No banco de dados *REACTOME*, o gene hiperexpresso representa ativação de metaloproteínases da matriz e sinalização por SCF-KIT e os hipoexpressos, sinalização pelas interleucinas e por IL-10.

4.4 Análise comparativa entre os dias de coleta

4.4.1 Sepses comprovada por bactérias Gram-positivas

A análise dos dados do sequenciamento identificou 31 genes diferencialmente expressos no grupo de RN com sepse causada por bactérias Gram-positivas entre os dias de coleta, considerando $p \leq 0,05$, como podemos verificar na **Tabela 12**. Podemos verificar a hipoexpressão do gene *IL-12B*, no dia 0 em relação ao dia 7, e do gene *MMP9* no dia 0 em relação aos dias 3 e 7 pós-diagnóstico.

Os resultados da expressão diferencial dos genes no grupo de sepse causada por bactérias Gram-positivas comparando-se dia 0 vs. 3, dia 0 vs. 7 e dia 3 vs. 7, estão representados no gráfico *Volcano plot*, respectivamente, nas **Figuras 8A, B e C**.

Tabela 12. Identificação e valor de expressão (FC) dos genes diferencialmente expressos no dia 0 vs. 3, dia 0 vs. 7 e dia 3 vs. 7 pós-diagnóstico do grupo de RN com sepsé causada por bactérias Gram-positivas.

	Símbolo do Gene	Nome do Gene	FC	Valor p
Dia 0 vs. 3	UP			
	IKBKG	<i>Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B Kinase Regulatory Subunit gamma</i>	2,51	0,04
	FASLG	<i>Fas Ligand</i>	1,63	0,03
	DOWN			
	CD80	<i>CD80 Molecule</i>	-5,36	0,02
	CASP1	<i>Caspase 1</i>	-4,10	0,001
	MMP9	<i>Matrix Metalloproteinase 9</i>	-3,02	0,02
	STAT3	<i>Signal Transducer And Activator of Transcription 3</i>	-2,80	0,0005
	MALT1	<i>MALT1 Paracaspase</i>	-2,09	0,04
	Dia 0 vs. 7	UP		
CXCL1		<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 1</i>	2,61	0,03
BCL10		<i>BCL10 Immune Signaling Adaptor</i>	2,35	0,03
NFKBIE		<i>NFKB Inhibitor Epsilon</i>	1,91	0,02
DOWN				
SELE		<i>Selectin E</i>	-6,58	0,02
HAMP		<i>Hepcidin Antimicrobial Peptide</i>	-6,45	0,03
IL12B		<i>Interleukin 12B</i>	-6,45	0,03
CXCL10		<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 10</i>	-6,35	0,03
C3		<i>Complement C3</i>	-6,37	0,03
IL33		<i>Interleukin 33</i>	-6,06	0,04
CCL22		<i>C-C Motif Chemokine Ligand 22</i>	-6,04	0,04
IFNB1		<i>Interferon Beta 1</i>	-6,04	0,04
VCAM1		<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>	-6,04	0,04
IL1R1		<i>Interleukin 1 Receptor Type 1</i>	-4,29	0,005
PTGS2		<i>Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2</i>	-3,60	0,02
MMP9	<i>Matrix Metalloproteinase 9</i>	-3,57	0,007	
CASP1	<i>Caspase 1</i>	-2,72	0,001	
Dia 3 vs. 7	UP			
	CXCL8	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 8</i>	3,71	0,04
	SOD2	<i>Superoxide Dismutase 2</i>	2,09	0,01
	STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>	1,70	0,02
	MYC	<i>MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor</i>	1,53	0,04
	DOWN			
	CD40	<i>CD40 Molecule</i>	-4,29	0,004
	TNFRSF10A	<i>TNF Receptor Superfamily Member 10a</i>	-3,60	0,02
	IL1R1	<i>Interleukin 1 Receptor Type 1</i>	-3,57	0,002
	IFNG	<i>Interferon Gamma</i>	-2,72	0,01

FC: Log₂ Fold Change; UP: gene hiperexpresso; DOWN: gene hipoexpresso.

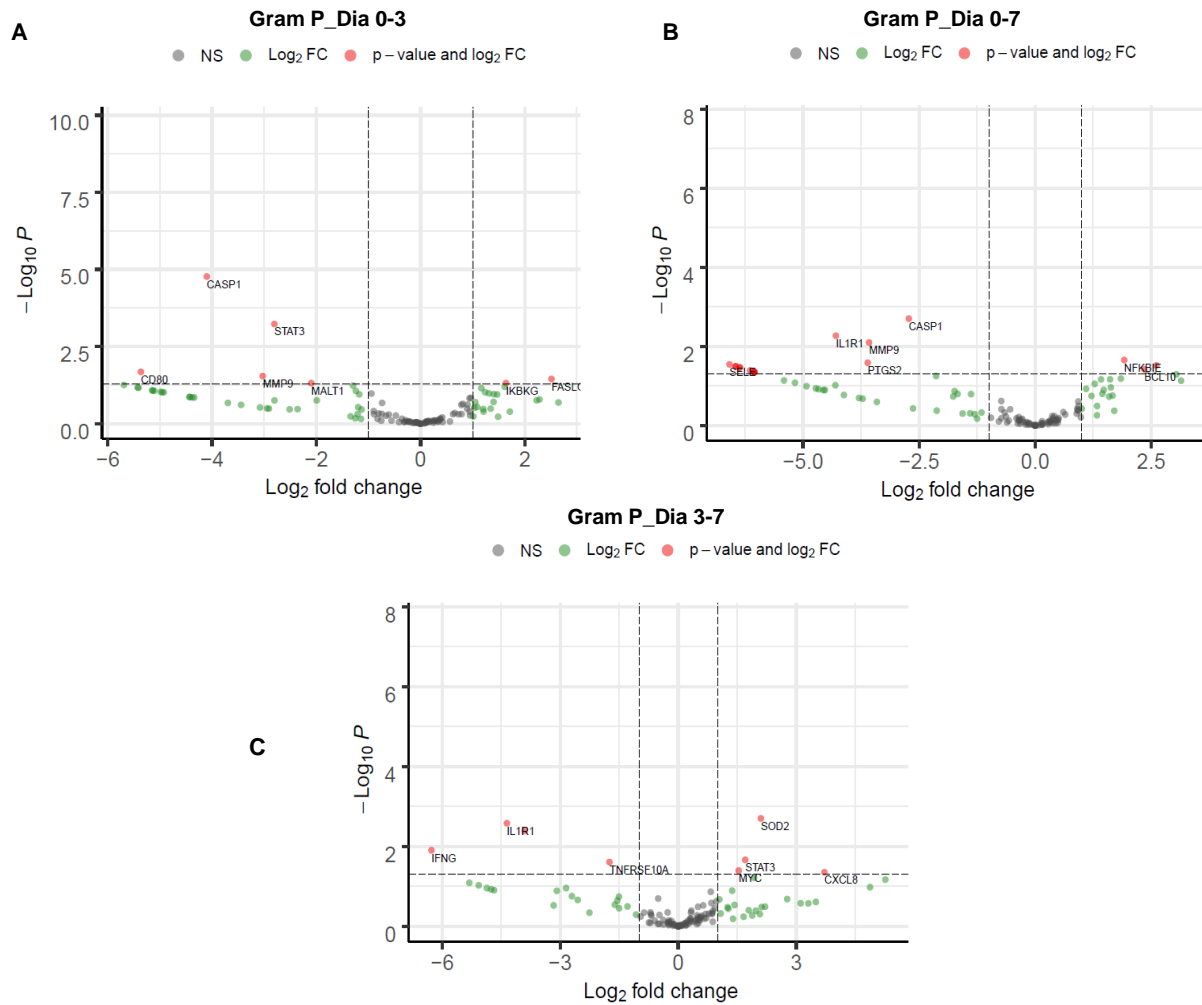


Figura 8. Volcano plot representando o *Fold Change* (eixo x) versus a significância (eixo y) dos genes hipo e hiperexpressos nos RN com sepse causada por bactérias Gram-positivas (Gram P) no dia 0 comparado ao dia 3 **(A)**, no dia 0 comparado ao dia 7 **(B)** e no dia 3 comparado ao dia 7 pós-diagnóstico **(C)**. Os pontos em vermelho representam os genes com expressão diferencial significativa. Os pontos em verde correspondem aos genes diferencialmente expressos, porém sem significância estatística e em cinza, genes não alterados (NS).

Foram designados os termos de ontologia gênica para os 31 genes diferencialmente expressos, conforme demonstrado na **Tabela 13**.

Tabela 13. Análises de enriquecimento das ontologias gênicas (GO) dos DEG entre os dias 0, 3 e 7 pós-diagnóstico dos RN com sepse por bactérias Gram-positivas.

	ID GO ¹	Descrição ²	Classe GO ³
	UP		
	GO:0043123	<i>Positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling</i>	P
	GO:0043122	<i>Regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling</i>	P
	GO:0007249	<i>I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling</i>	P
	GO:1901214	<i>Regulation of neuron death</i>	P
	GO:0070997	<i>Neuron death</i>	P
	GO:0042975	<i>Peroxisome proliferator activated receptor binding</i>	F
	GO:0005123	<i>Death receptor binding</i>	F
	GO:0070530	<i>K63-linked polyubiquitin modification-dependent protein binding</i>	F
Dia 0 vs. 3	GO:0005164	<i>Tumor necrosis factor receptor binding</i>	F
	GO:0031593	<i>Polyubiquitin modification-dependent protein binding</i>	F
	GO:0005901	<i>Caveola</i>	C
	GO:1902554	<i>Serine/threonine protein kinase complex</i>	C
	GO:0043202	<i>Lysosomal lumen</i>	C
	GO:0044853	<i>Plasma membrane raft</i>	C
	GO:0072686	<i>Mitotic spindle</i>	C
	GO:1902911	<i>Protein kinase complex</i>	C
	DOWN		
	GO:0052548	<i>Regulation of endopeptidase activity</i>	P
	GO:0052547	<i>Regulation of peptidase activity</i>	P
	GO:0001819	<i>Positive regulation of cytokine production</i>	P
	GO:0004175	<i>Endopeptidase activity</i>	F
	UP		
	GO:0071222	<i>Cellular response to lipopolysaccharide</i>	P
	GO:0071219	<i>Cellular response to molecule of bacterial origin</i>	P
	GO:0071216	<i>Cellular response to biotic stimulus</i>	P
	GO:0043422	<i>Protein kinase B binding</i>	F
	GO:0050700	<i>CARD domain binding</i>	F
Dia 0 vs. 7	GO:0001772	<i>Immunological synapse</i>	C
	DOWN		
	GO:0071222	<i>Cellular response to lipopolysaccharide</i>	P
	GO:0071219	<i>Cellular response to molecule of bacterial origin</i>	P
	GO:0001819	<i>Positive regulation of cytokine production</i>	P
	GO:0050727	<i>Regulation of inflammatory response</i>	P
	GO:0048018	<i>Receptor ligand activity</i>	F
	GO:0009897	<i>External side of plasma membrane</i>	C
	UP		
	GO:1904018	<i>Positive regulation of vasculature development</i>	P
	GO:0042379	<i>Chemokine receptor binding</i>	F
	GO:0070491	<i>Repressing transcription factor binding</i>	F
Dia 3 vs. 7	GO:0000785	<i>Chromatin</i>	C
	DOWN		
	GO:0002699	<i>Positive regulation of immune effector process</i>	P
	GO:0002020	<i>Protease binding</i>	F
	GO:0009897	<i>External side of plasma membrane</i>	C

UP: gene hiperexpresso; DOWN: gene hipoexpresso; ¹Identificador do termo de ontologia gênica; ²Descrição do termo de ontologia gênica; ³Categoria na qual são classificados os termos de ontologia gênica. P: processo biológico, F: função molecular, C: componente celular.

Nos termos *GO* significativamente enriquecidos ($p \leq 0,05$) para o dia 0 em relação aos dias 3 e 7 é possível observar que as vias enriquecidas para os genes hiperexpressos são relacionadas principalmente à via de sinalização do NF- κ B, ligação ao receptor de TNF e de morte, ao domínio de ligação *CARD* (inflamassomo) e a resposta celular às moléculas de origem bacteriana e lipopolissacarídeo.

De acordo com o *KEGG*, os genes hiperexpressos no dia 0 vs. 3 estão relacionados a vias metabólicas ligadas a apoptose, enquanto os genes hipoexpressos estão relacionados às vias de sinalização das interleucinas e receptores ligados a morte celular. No dia 0 vs. 7, os genes hiperexpressos encontram-se em vias de sinalização dos receptores das células T e B e da via de sinalização do NF- κ B, enquanto os genes hipoexpressos estão ligados à via de sinalização de TNF. No dia 3 vs. dia 7, os genes hiperexpressos encontram-se ligados à via de infecção do citomegalovírus e os hipoexpressos à via de interação dos receptores de citocinas.

4.4.2 Sepsis comprovada por bactérias Gram-negativas

A análise dos dados do sequenciamento identificou 12 genes diferencialmente expressos (DEG) no grupo de sepsis causada por bactérias Gram-negativas entre os dias de coleta, considerando $p \leq 0,05$, como podemos verificar na **Tabela 14**. Destaca-se a hiperexpressão do gene *TREM1* no dia 0 em relação aos dias 3 e 7 pós-diagnóstico e a hipoexpressão do gene *IL-12B* no dia 0 em relação ao dia 7, assim como já observado anteriormente no grupo de sepsis por bactérias Gram-positivas.

Tabela 14. Identificação e valor de expressão (FC) dos genes diferencialmente expressos no dia 0 vs. 3, dia 0 vs. 7 e dia 3 vs. 7 pós-diagnóstico do grupo de RN com sepse causada por bactérias Gram-negativas.

	Símbolo do Gene	Nome do Gene	FC	Valor p
Dia 0 vs. 3	UP			
	TREM1	<i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1</i>	2,55	0,01
	DOWN			
	TRADD	<i>TNFRSF1A Associated Via Death Domain</i>	-3,87	0,01
	TNFRSF10A	<i>TNF Receptor Superfamily Member 10A</i>	-2,66	0,02
	BIRC2	<i>Baculoviral IAP Repeat Containing 2</i>	-1,67	0,03
Dia 0 vs. 7	UP			
	TREM1	<i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1</i>	2,12	0,01
	LTBR	<i>Lymphotoxin Beta Receptor</i>	2,02	0,03
	DOWN			
	IL12B	<i>Interleukin 1 Receptor Type 1</i>	-6,79	0,02
Dia 3 vs. 7	UP			
	PDGFB	<i>Platelet Derived Growth Factor Subunit B</i>	9,16	0,009
	HAMP	<i>Hepcidin Antimicrobial Peptide</i>	6,60	0,008
	TRADD	<i>TNFRSF1A Associated Via Death Domain</i>	3,58	0,01
	CDKN1A	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>	2,72	0,02
	TNFAIP3	<i>TNF Alpha Induced Protein 3</i>	2,37	0,04

FC: Log₂ Fold Change; UP: gene hiperexpresso; DOWN: gene hipoexpresso.

A seguir, na **Figura 9A, B e C**, os resultados dos genes diferencialmente expressos no grupo de sepse causada por bactérias Gram-negativas comparando-se dia 0 vs. 3, dia 0 vs. 7 e dia 3 vs. 7, respectivamente, estão representados no gráfico *Volcano plot*.

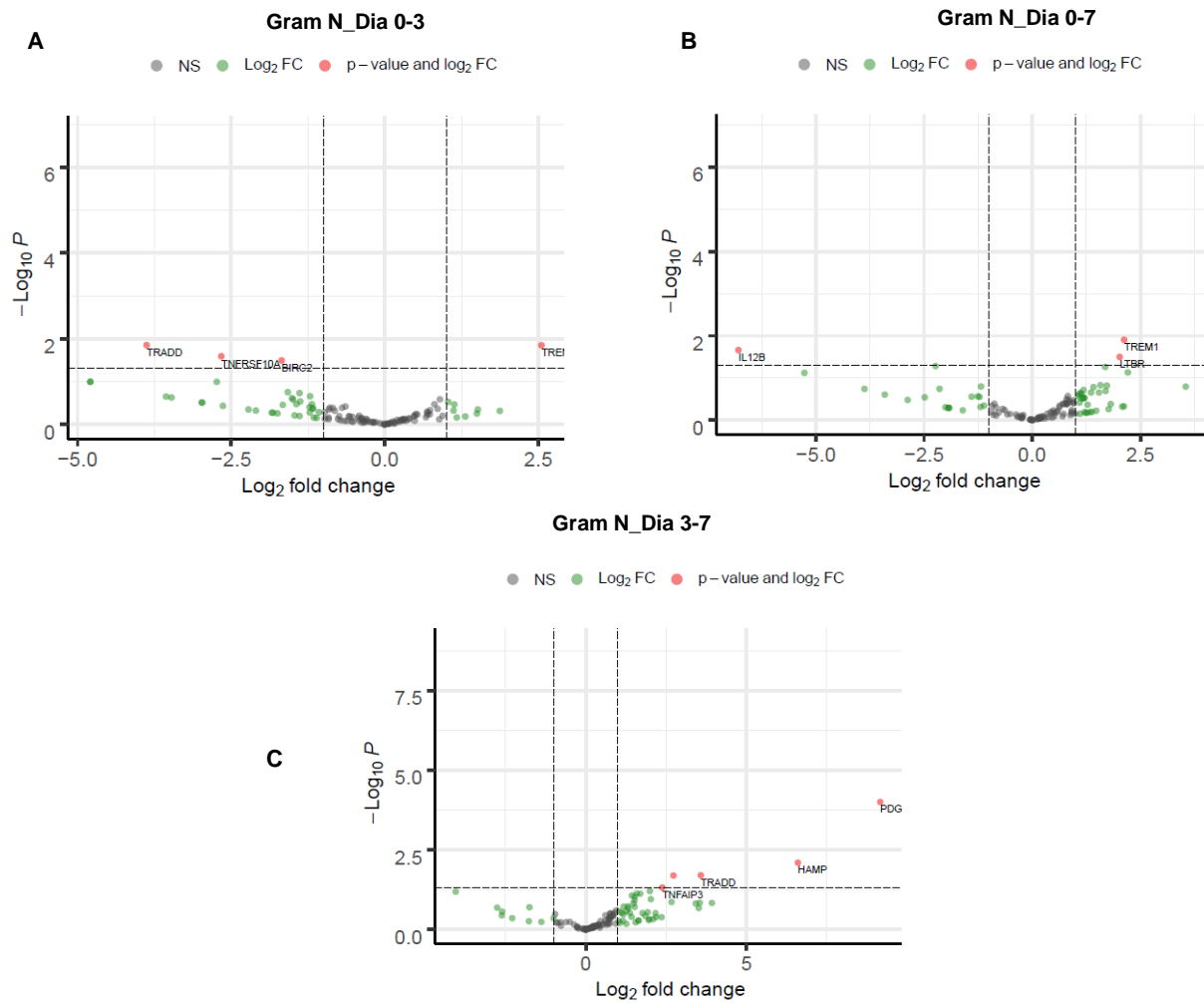


Figura 9. Volcano plot representando o *Fold Change* (eixo x) versus a significância (eixo y) dos genes hipoexpressos e hiperexpressos nos RN com sepse causada por bactérias Gram-negativas (Gram N) no dia 0 comparado ao dia 3 **(A)**, no dia 0 comparado ao dia 7 **(B)** e no dia 3 comparado ao dia 7 pós-diagnóstico **(C)**. Os pontos em verde correspondem aos genes diferencialmente expressos, porém sem significância estatística e em cinza, genes não alterados (NS).

Foram designados os termos GO para os 12 genes diferencialmente expressos, conforme demonstrado na **Tabela 15**.

Tabela 15. Análises de enriquecimento das ontologias gênicas (GO) dos DEG entre os dias 0, 3 e 7 pós-diagnóstico dos RN com sepse por bactérias Gram-negativas.

	ID GO¹	Descrição²	Classe GO³
Dia 0 vs. 3	UP		
	GO:0002526	<i>Acute inflammatory response</i>	P
	GO:0006959	<i>Humoral immune response</i>	P
	GO:0050900	<i>Leukocyte migration</i>	P
	GO:0097110	<i>Scaffold protein binding</i>	F
	DOWN		
	GO:1901222	<i>Regulation of NIK/NF-kappaB signaling</i>	P
	GO:0038061	<i>NIK/NF-kappaB signaling</i>	P
	GO:0043281	<i>Regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process</i>	P
	GO:2000116	<i>Regulation of cysteine-type endopeptidase activity</i>	P
	GO:0052548	<i>Regulation of endopeptidase activity</i>	P
	GO:0052547	<i>Regulation of peptidase activity</i>	P
	GO:0070513	<i>Death domain binding</i>	F
	GO:0005035	<i>Death receptor activity</i>	F
	GO:0005068	<i>Transmembrane receptor protein tyrosine kinase adaptor activity</i>	F
	GO:0045121	<i>Membrane raft</i>	C
GO:0098857	<i>Membrane microdomain</i>	C	
GO:0016020	<i>Membrane region</i>	C	
Dia 0 vs. 7	UP		
	GO:0043011	<i>Myeloid dendritic cell differentiation</i>	P
	GO:0097110	<i>Scaffold protein binding</i>	F
	DOWN		
	GO:0001787	<i>Natural killer cell proliferation</i>	P
	GO:0043379	<i>Memory T cell differentiation</i>	P
	GO:0051133	<i>Regulation of NK T cell activation</i>	P
	GO:0004896	<i>Cytokine receptor activity</i>	F
	GO:0019955	<i>Cytokine binding</i>	F
	GO:0070851	<i>Growth factor receptor binding</i>	F
GO:0008083	<i>Growth factor activity</i>	F	
GO:0031904	<i>Endosome lumen</i>	C	
Dia 3 vs. 7	UP		
	GO:0000079	<i>Regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity</i>	P
	GO:1904029	<i>Regulation of cyclin-dependent protein kinase activity</i>	P
	GO:0061041	<i>Regulation of wound healing</i>	P
	GO:0048660	<i>Regulation of smooth muscle cell proliferation</i>	P
	GO:0048659	<i>Smooth muscle cell proliferation</i>	P
	GO:1903034	<i>Regulation of response to wounding</i>	P
GO:0048018	<i>Receptor ligand activity</i>	F	

UP: gene hiperexpresso; *DOWN*: gene hipoexpresso; ¹Identificador do termo de ontologia gênica; ²Descrição do termo de ontologia gênica; ³Categoria na qual são classificados os termos de ontologia gênica. P: processo biológico, F: função molecular, C: componente celular.

No banco de dados *KEGG* observamos que, no dia 0 vs. 3, os genes hipoexpressos encontram-se em vias ligadas à apoptose, necroptose e infecção por *Salmonella*; no dia 0 vs. 7, os genes hiperexpressos estão relacionados à vias da rede imunológica intestinal para produção de IgA, via de interação de proteína viral com receptores de citocinas e vias de sinalização do NF- κ B e HIF-1. No dia 3 vs. dia 7, os genes estão relacionados à via de infecção do vírus *Epstein-Barr*.

4.4.3 Sepses clínicas

A análise dos dados do sequenciamento identificou sete genes diferencialmente expressos no grupo de sepsis clínicas entre os dias de coleta, considerando $p \leq 0,05$, como podemos verificar na **Tabela 16**. O número de DEG é menor quando comparamos com os resultados já apresentados anteriormente para os grupos de sepsis comprovada por bactérias Gram-positivas e negativas. Destaca-se a hiperexpressão do *IRF1* no dia 0 em relação ao dia 3 e a hipoexpressão do *FOXP3* no dia 3 em comparação ao dia 7 pós-diagnóstico.

Tabela 16. Identificação e valor de expressão (FC) dos genes diferencialmente expressos no dia 0 vs. 3, dia 0 vs. 7 e dia 3 vs. 7 pós-diagnóstico do grupo de RN com sepse clínica.

	Símbolo do Gene	Nome do Gene	FC	Valor p
	UP			
Dia 0 vs. 3	IRF1	<i>Interferon Regulatory Factor 1</i>	1,50	0,03
	CASP8	<i>Caspase 8</i>	1,32	0,04
	UP			
Dia 0 vs. 7	SELP	<i>Selectin P</i>	2,83	0,02
	DOWN			
	CXCL9	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 9</i>	-5,71	0,02
	UP			
Dia 3 vs. 7	IL18	<i>Interleukin 18</i>	3,04	0,04
	DOWN			
	PDGFB	<i>Platelet Derived Growth Factor Subunit B</i>	-5,98	0,02
	FOXP3	<i>Forkhead Box P3</i>	-3,77	0,04

FC: Log₂ Fold Change; UP: gene hiperexpresso; DOWN: gene hipoexpresso.

A seguir, na **Figura 10A, B e C**, os resultados da expressão diferencial dos genes no grupo de sepse clínica comparando-se dia 0 vs. 3, dia 0 vs. 7 e dia 3 vs. 7, respectivamente, estão representados graficamente no *Volcano plot*.

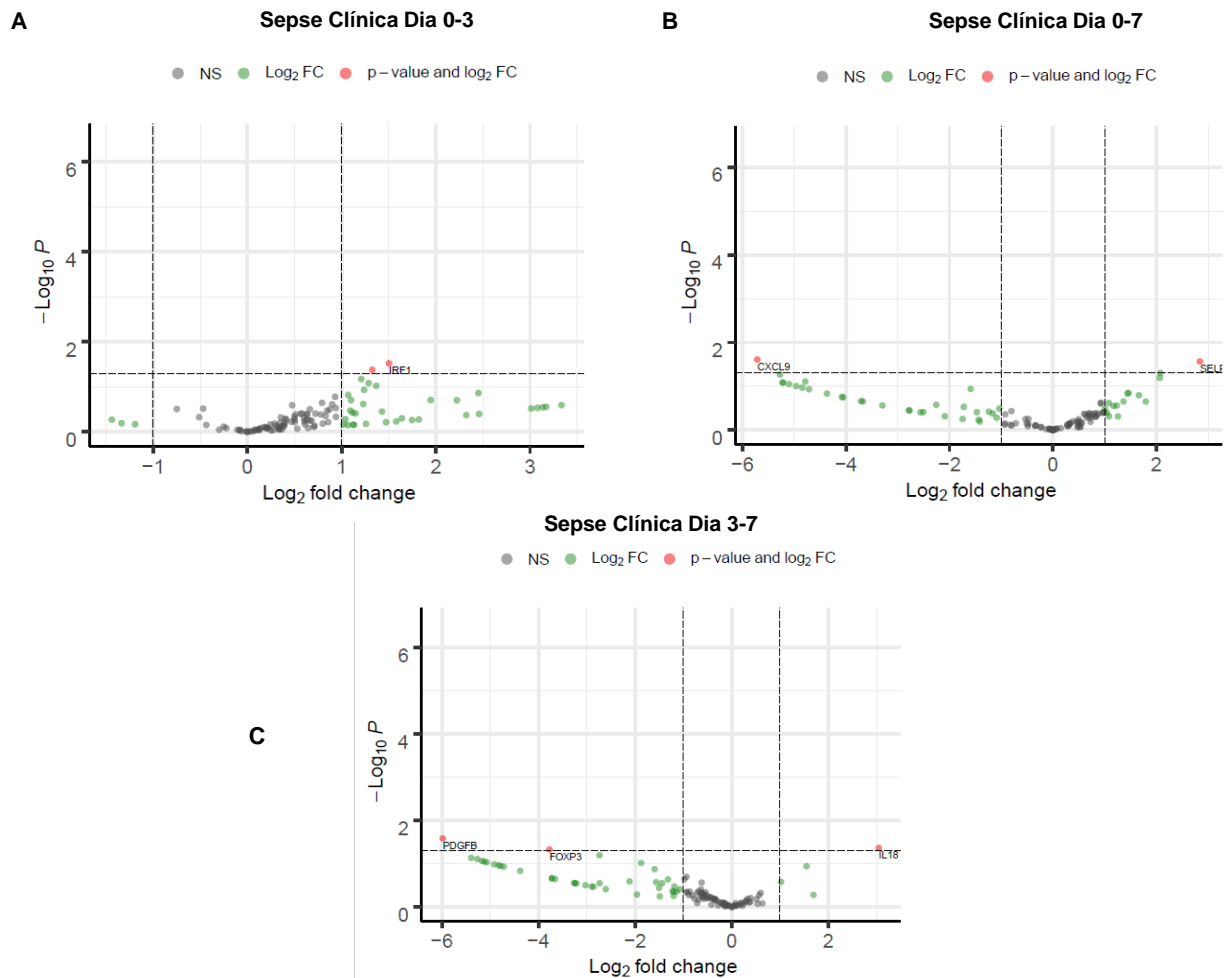


Figura 10. *Volcano plot* representando o *Fold Change* (eixo x) versus a significância (eixo y) dos genes hiperexpressos e dos genes hipoexpressos nos RN com sepse clínica no dia 0 comparado ao dia 3 **(A)**, no dia 0 comparado ao dia 7 **(B)** e no dia 3 comparado ao dia 7 pós-diagnóstico **(C)**. Os pontos em vermelho representam os genes com expressão diferencial significativa. Os pontos em verde correspondem aos genes diferencialmente expressos, porém sem significância estatística e em cinza, genes não alterados (NS).

Foram identificados os termos *GO* aos sete genes diferencialmente expressos, conforme demonstrado na **Tabela 17**.

Tabela 17. Análises de enriquecimento das ontologias gênicas (GO) nos DEG do grupo de RN com sepse clínica entre os dias 0, 3 e 7.

	ID GO¹	Descrição²	Classe GO³
	UP		
Dia 0 vs. 3	GO:0071260	<i>Cellular response to mechanical stimulus</i>	P
	GO:0097153	<i>Cysteine-type endopeptidase activity in apoptotic process</i>	F
	GO:0005123	<i>Death receptor binding</i>	F
	GO:0005741	<i>Mitochondrial outer membrane</i>	C
	GO:0031968	<i>Organelle outer membrane</i>	C
	GO:0019867	<i>Outer membrane</i>	C
	GO:0045121	<i>Membrane raft</i>	C
	GO:0098857	<i>Membrane microdomain</i>	C
	GO:0016020	<i>Membrane region</i>	C
	UP		
Dia 0 vs. 7	GO:0033623	<i>Regulation of integrin activation</i>	P
	GO:0033622	<i>Integrin activation</i>	P
	GO:0035584	<i>Calcium-mediated signaling using intracellular calcium source</i>	P
	GO:0050901	<i>Leukocyte tethering or rolling</i>	P
	GO:0030194	<i>Positive regulation of blood coagulation</i>	P
	GO:0033691	<i>Sialic acid binding</i>	F
	GO:0070492	<i>Oligosaccharide binding</i>	F
	GO:0031092	<i>Platelet alpha granule membrane</i>	C
	GO:0042827	<i>Platelet dense granule</i>	C
	DOWN		
	GO:1990868	<i>Response to chemokine</i>	P
	GO:1990869	<i>Cellular response to chemokine</i>	P
	GO:0030593	<i>Neutrophil chemotaxis</i>	P
	GO:0045236	<i>CXCR chemokine receptor binding</i>	F
	GO:0009897	<i>External side of plasma membrane</i>	C
	UP		
	GO:0001787	<i>Natural killer cell proliferation</i>	P
	GO:0051133	<i>Regulation of NK T cell activation</i>	P
	GO:0005125	<i>Cytokine activity</i>	F
	GO:0005126	<i>Cytokine receptor binding</i>	F
	DOWN		
Dia 3 vs. 7	GO:0050866	<i>Negative regulation of cell activation</i>	P
	GO:0032102	<i>Negative regulation of response to external stimulus</i>	P
	GO:0051052	<i>Regulation of DNA metabolic process</i>	P
	GO:0016176	<i>Superoxide-generating NADPH oxidase activator activity</i>	F
	GO:0048407	<i>Platelet-derived growth factor binding</i>	F
	GO:0005161	<i>Platelet-derived growth factor receptor binding</i>	F
	GO:0031093	<i>Platelet alpha granule lumen</i>	C
	GO:0031091	<i>Platelet alpha granule</i>	C
	GO:0005796	<i>Golgi lumen</i>	C

UP: gene hiperexpresso; DOWN: gene hipoexpresso; ¹Identificador do termo de ontologia gênica; ²Descrição do termo de ontologia gênica; ³Categoria na qual são classificados os termos de ontologia gênica. P: processo biológico, F: função molecular, C: componente celular.

Nos termos GO significativamente enriquecidos para os genes hiperexpressos no dia 0 em relação aos dias 3 e 7 é possível observar que as vias enriquecidas são relacionadas principalmente à membrana celular, ligação a receptor de morte, ativação de integrinas, migração leucocitária e coagulação, que também é visualizada na comparação do dia 3 vs. 7 pós-diagnóstico, porém nos genes hipoexpressos. Os genes hipoexpressos no dia 0 comparados com o dia 7 relacionam-se a resposta à quimiocinas e quimiotaxia de neutrófilos.

De acordo com o KEGG, os genes hiperexpressos no dia 0 vs. 3 representam vias metabólicas ligadas ao receptor da proteína lectina do tipo C, via de sinalização de TNF e do papilomavírus humano. No dia 0 vs. 7, os genes hiperexpressos relacionam-se com vias de infecção de *Staphylococcus aureus* e os hipoexpressos, à via de interação de proteína viral com receptores de citocinas. Interessantemente, no dia 3 vs. dia 7, os genes hiperexpressos estão ligados à via de doenças infecciosas ligadas ao vírus sincicial respiratório, que pode sugerir uma infecção viral não identificada nesses casos.

4.5 Análise da expressão diferencial como marcador de prognóstico

A análise dos genes diferencialmente expressos identificou 36 genes DEG no grupo de pacientes que vieram a óbito em relação ao grupo que teve alta hospitalar. Foi evidenciado apenas um gene hiperexpresso e 35 genes hipoexpressos, considerando $p \leq 0,05$, como podemos verificar na **Tabela 18**.

Tabela 18. Identificação e valor de expressão (FC) dos genes diferencialmente expressos no grupo de RN que foram à óbito em relação aos que tiveram alta.

Símbolo do Gene	Nome do Gene	FC	Valor p
UP			
TREM1	<i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1</i>	1,15	0,02
DOWN			
TRADD	<i>TNFRSF1A Associated Via Death Domain</i>	-4,17	0,02
CD27	<i>CD27 Molecule</i>	-3,97	0,02
PLAU	<i>Plasminogen Activator, Urokinase</i>	-3,68	0,007
CD40	<i>CD40 Molecule</i>	-3,62	0,0001
CXCL2	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 2</i>	-3,41	0,01
CARD11	<i>Caspase Recruitment Domain Family Member 11</i>	-3,35	0,02
IRAK1	<i>Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 1</i>	-3,16	0,09
CD83	<i>CD83 Molecule</i>	-2,90	0,01
FOXP3	<i>Forkhead Box P3</i>	-2,73	0,01
AKT1	<i>AKT Serine/Threonine Kinase 1</i>	-2,59	0,001
MALT1	<i>MALT1 Paracaspase</i>	-2,41	0,07
RIPK1	<i>Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 1</i>	-2,36	0,001
IKBKE	<i>Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Epsilon</i>	-2,34	0,0004
TNFRSF10A	<i>TNF Receptor Superfamily Member 10A</i>	-2,23	0,0004
RELB	<i>RELB Proto-Oncogene, NF-KB Subunit</i>	-2,21	0,02
ATF1	<i>Activating Transcription Factor 1</i>	-2,19	0,004
BIRC3	<i>Baculoviral IAP Repeat Containing 3</i>	-2,14	0,0007
MYC	<i>MYC Proto-Oncogene BHLH Transcription Factor</i>	-2,10	0,0001
XIAP	<i>X-Linked Inhibitor of Apoptosis</i>	-2,05	0,02
CSF1	<i>Colony Stimulating Factor 1</i>	-2,00	0,003
MAP3K1	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1</i>	-1,93	0,04
MAP2K6	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 6</i>	-1,85	0,01
RAF1	<i>Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase</i>	-1,88	0,0008
STAT1	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i>	-1,87	0,001
TNFSF14	<i>TNF Superfamily Member 14</i>	-1,73	0,03
NFKB1	<i>Nuclear Factor Kappa B Subunit 1</i>	-1,55	0,01
TRAF6	<i>TNF Receptor Associated Factor 6</i>	-1,54	0,01
IKBKG	<i>Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B Kinase Regulatory Subunit Gamma</i>	-1,50	0,007
ELK1	<i>ETS Transcription Factor ELK1</i>	-1,48	0,01
TBK1	<i>TANK Binding Kinase 1</i>	-1,43	0,03
TNFAIP3	<i>TNF Alpha Induced Protein 3</i>	-1,42	0,04
CASP8	<i>Caspase 8</i>	-1,40	0,004
TP53	<i>Tumor Protein P53</i>	-1,24	0,02
TNFSF10	<i>TNF Superfamily Member 10</i>	-1,23	0,01
CASP1	<i>Caspase 1</i>	-1,10	0,02

FC: Log₂ Fold Change; UP: gene hiperexpresso; DOWN: gene hipoexpresso.

A seguir, na **Figura 11**, os resultados da expressão diferencial dos genes estão representados no *Volcano plot*, onde podemos evidenciar o único gene hiperexpresso nos RN que foram à óbito (*TREM1*).

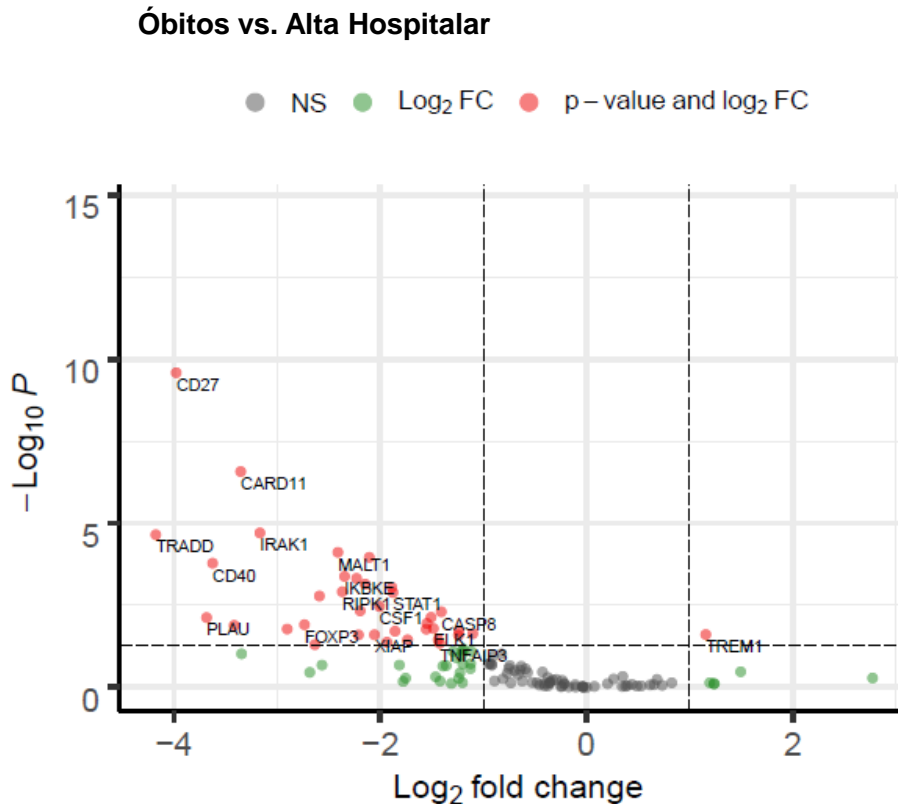


Figura 11. *Volcano plot* representando o *Fold Change* (eixo x) versus a significância (eixo y) dos genes hipoexpressos e do gene hiperexpresso nos RN que foram à óbito em relação aos que tiveram alta. Os pontos em vermelho representam os genes com expressão diferencial significativa. Os pontos em verde correspondem aos genes diferencialmente expressos, porém sem significância estatística e em cinza, genes não alterados (NS).

Foram identificados os termos *GO* aos 36 genes diferencialmente expressos, conforme demonstrado na **Tabela 19**. Podemos observar que os genes hipoexpressos estão relacionados à sinalização da via do NF- κ B, regulação da resposta imune inata e ligação ao receptor de citocinas.

Tabela 19. Análises de enriquecimento das ontologias gênicas (GO) dos DEG dos casos que foram à óbito.

ID GO ¹	Descrição ²	Classe GO ³
GO:0007249	<i>I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling</i>	P
GO:0045088	<i>Regulation of innate immune response</i>	P
DOWN GO:0005126	<i>Cytokine receptor binding</i>	F
GO:0016020	<i>Membrane region</i>	C

DOWN: gene hipoexpresso; ¹Identificador do termo de ontologia gênica; ²Descrição do termo de ontologia gênica; ³Categoria na qual são classificados os termos de ontologia gênica. P: processo biológico, F: função molecular, C: componente celular.

De acordo com o *KEGG*, os genes hipoexpressos representam vias metabólicas ligadas a vias de sinalização do NF- κ B, via de sinalização do vírus *Epstein-Barr* e dos receptores *Toll-like*. E pelo *REACTOME*, vias ligadas a sinalização por interleucinas.

4.6 Validação funcional dos genes diferencialmente expressos por ensaio imunoenzimático

No presente estudo, foi utilizada uma abordagem funcional para validação dos genes diferencialmente expressos através da quantificação das concentrações de algumas proteínas séricas por ELISA. A expressão diferencial do gene *MBL2* foi notada nos grupos de sepse causada por bactérias Gram-positivas e negativas, que revelaram hiperexpressão em relação aos controles e, até mesmo, entre alguns dias de coleta dentro de cada grupo.

Conforme mostrado na **Figura 12**, observamos uma maior concentração da proteína solúvel MBL2 nos grupos de sepse comprovada causada por

bactérias Gram-positivas e negativas em relação aos controles, o que não foi observado para o grupo de sepse clínica. A expressão do gene *MBL2* seguiu o mesmo perfil da concentração proteica de MBL2, validando funcionalmente o gene.

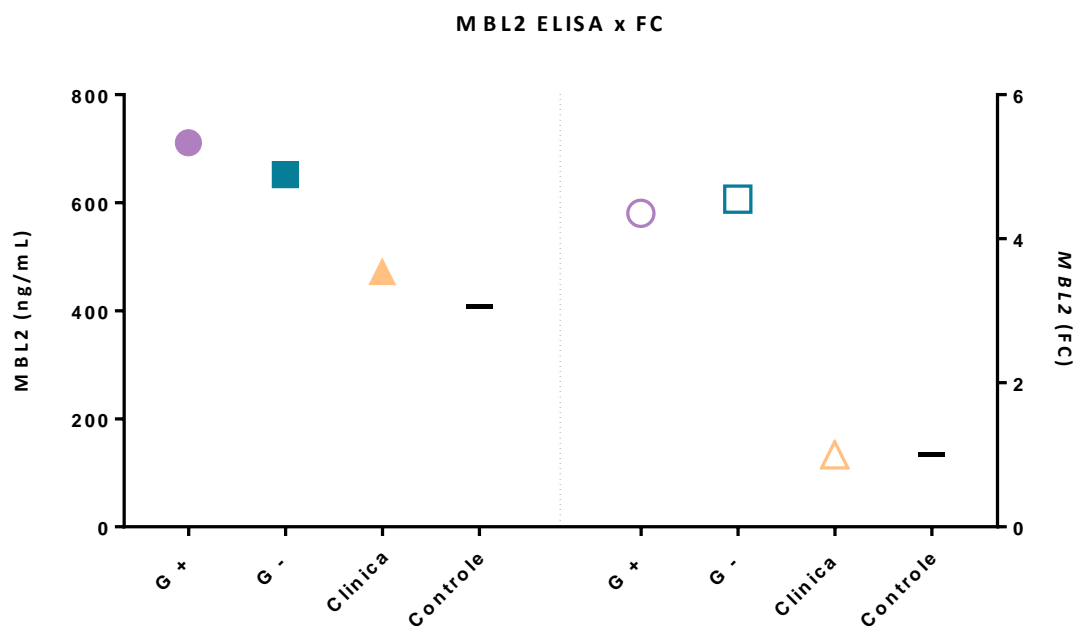


Figura 12. Gráfico representando as concentrações médias do MBL2 solúvel (eixo y da esquerda) e valores de *Fold Change* (FC) (eixo y da direita) dos diferentes grupos de sepse (Gram-positivo, G+; Gram-negativo, G-; e sepse clínica) em relação aos controles obtidos por RNA-Seq para o gene *MBL2*.

A seguir, na **Figura 13**, a expressão diferencial do gene *MMP9* foi notada nos grupos de sepse causada por bactérias Gram-positivas e negativas, assim como no grupo de sepse clínica, que revelaram hiperexpressão em relação aos controles. No teste de ELISA, podemos observar uma maior concentração da proteína solúvel MMP-9 em todos os grupos em relação aos controles, validando funcionalmente sua expressão gênica.

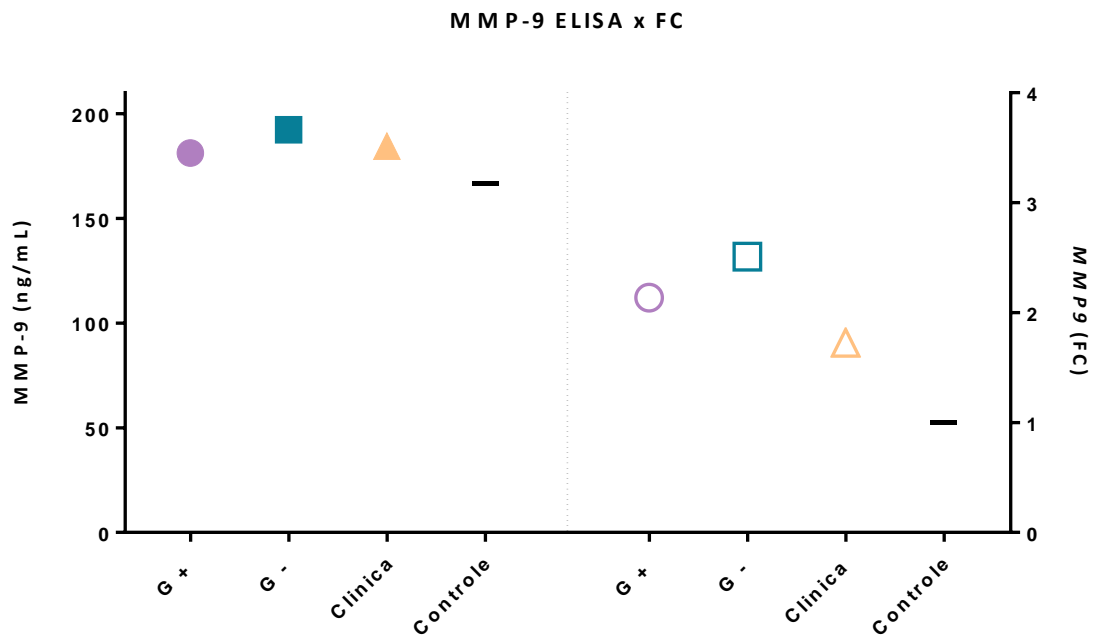


Figura 13. Gráfico representando as concentrações médias do MMP-9 solúvel (eixo y da esquerda) e valores de *Fold Change* (FC) (eixo y da direita) dos diferentes grupos de sepse (Gram-positivo, G⁺; Gram-negativo, G⁻; e sepse clínica) em relação aos controles obtidos por RNA-Seq para o gene *MMP9*.

Para o grupo de sepse clínica, a validação funcional por ELISA foi realizada para o gene hipoexpresso *ESM1* e os resultados da proteína solúvel Endocan, também chamada de molécula-1 específica da célula endotelial (ESM-1), estão representados na **Figura 14**, a seguir, que mostra uma menor concentração proteica de Endocan no grupo de sepse clínica, validando funcionalmente o gene *ESM1*.

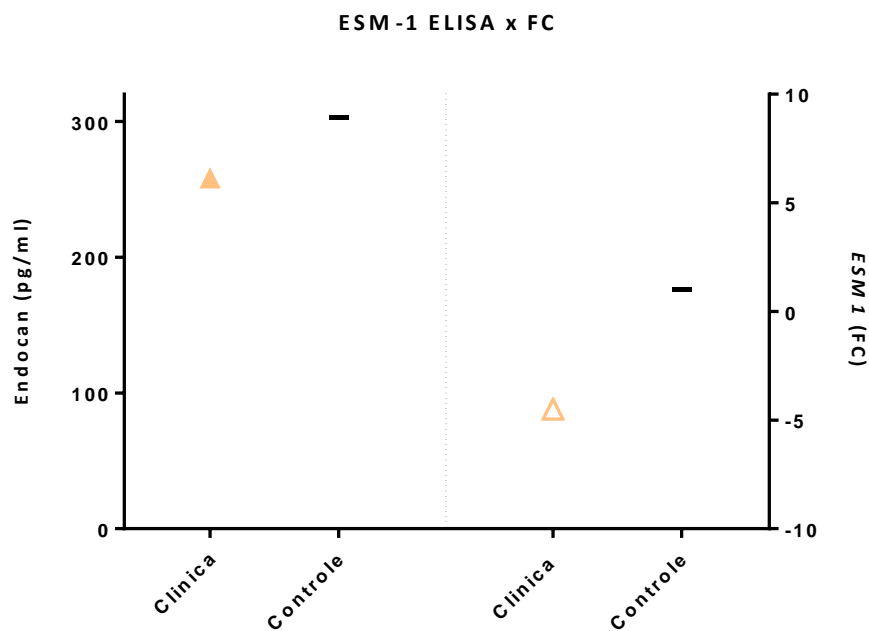


Figura 14. Gráfico representando as concentrações médias do Endocan solúvel (eixo y da esquerda) e valores de *Fold Change* (FC) (eixo y da direita) do grupo dos RN com sepse clínica em relação aos controles obtidos por RNA-Seq para o gene *ESM1*.

Na **Figura 15**, estão representadas as concentrações da proteína TREM-1 solúvel e da expressão do gene *TREM1* obtidos com as amostras dos RN do grupo de sepse causada por bactérias Gram-negativas coletadas nos dias 0, 3 e 7 pós-diagnóstico. Observamos um aumento da concentração da proteína solúvel no dia 0, corroborando com o aumento da expressão gênica nesse mesmo dia de coleta. No dia 3 e 7, há uma redução da concentração proteica em relação ao dia 0, em concordância com a não expressão diferencial desse gene nos mesmos dias.

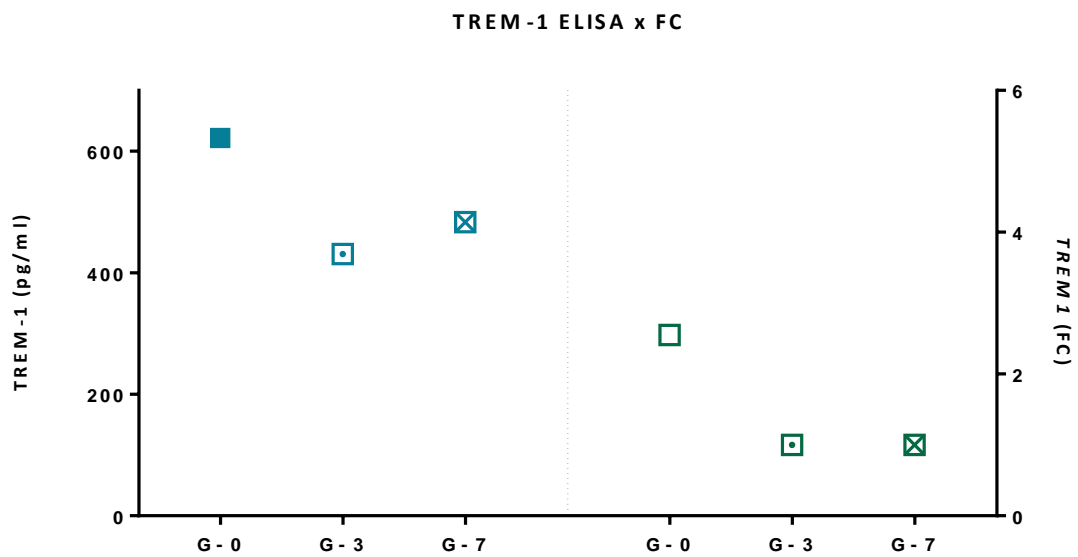


Figura 15. Gráfico representando as concentrações médias do TREM-1 solúvel (eixo y da esquerda) e valores de *Fold Change* (FC) (eixo y da direita) do grupo dos RN com sepse causada por bactérias Gram-negativas (G-) nos dias de coleta 0, 3 e 7 obtidos por RNA-Seq para o gene *TREM1*.

A seguir, na **Figura 16**, estão representadas as concentrações proteicas de IL-12 e os valores de expressão do gene *IL12B* obtidos com as amostras dos RN do grupo de sepse causada por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, coletadas nos dias 0 e 7 pós-diagnóstico. Podemos observar um aumento da concentração da proteína solúvel no dia 7 em relação ao dia 0, corroborando com o aumento da expressão gênica nesse mesmo dia de coleta.

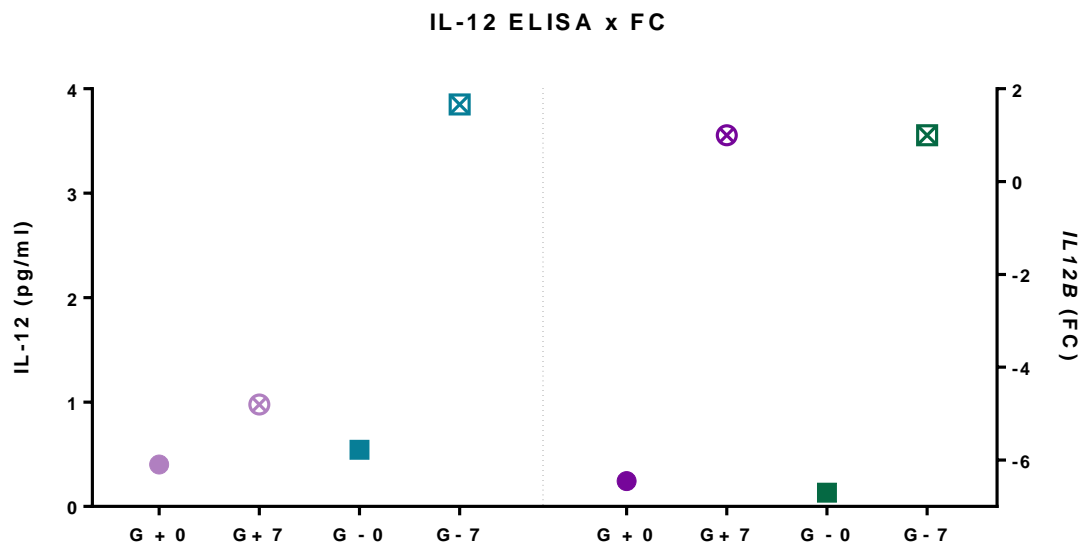


Figura 16. Gráfico representando as concentrações médias do IL-12 sérica (eixo y da esquerda) e valores de *Fold Change* (FC) (eixo y da direita) do grupo dos RN com sepse causada por bactérias Gram-positivas (G+) e por bactérias Gram-negativas (G-) nos dias de coleta 0 e 7 obtidos por RNA-Seq para o gene *IL12B*.

As concentrações de TREM-1 solúvel também foram analisadas nas amostras dos RN que foram à óbito em relação aos que tiveram alta. Os resultados mostraram uma maior concentração da proteína solúvel no grupo que foi à óbito, corroborando com o aumento da expressão gênica de *TREM1* (Figura 17).

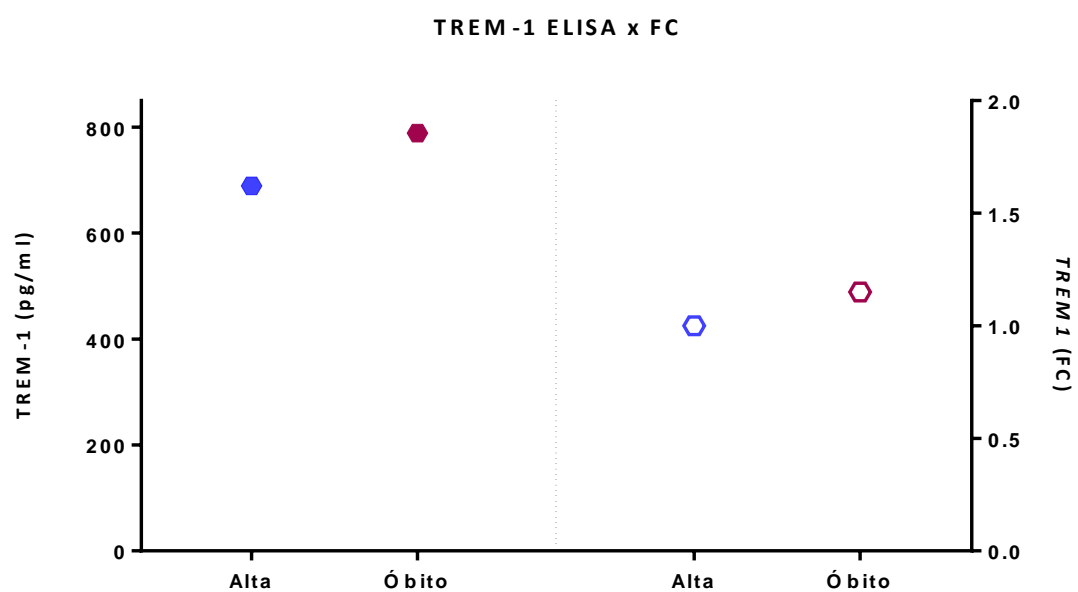


Figura 17. Gráfico representando as concentrações médias do TREM-1 solúvel (eixo y da esquerda) e valores de *Fold Change* (FC) (eixo y da direita) do grupo dos RN que foram à óbito em relação aos que tiveram alta por RNA-Seq para o gene *TREM1*.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho propôs avaliar a expressão de genes envolvidos na via de sinalização do NF- κ B em RN com sepse neonatal tardia comprovada por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e sepse neonatal tardia clínica no dia 0 (diagnóstico), no dia 3 (fase aguda) e no dia 7 (convalescência) de coleta e com isso, auxiliar no diagnóstico precoce e no prognóstico de outros RN com essa condição.

Em nosso trabalho, realizamos as coletas temporais, pois alguns estudos já demonstraram que a expressão gênica, principalmente de citocinas, ocorre de acordo com uma cinética de produção pelo organismo em diferentes tempos pós-estímulo e, com isso, nossa intenção era detectar essas diferenças utilizando também as coletas em dias diferentes, acompanhando o tratamento com antibióticos (Kumolosasi et al., 2014; Anirudhan et al., 2020).

Foi relatado que os níveis séricos de TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 aumentaram significativamente em RN com sepse em relação aos controles e diminuíram no sétimo dia após o tratamento com antibióticos e, portanto, essas citocinas são consideradas úteis para o diagnóstico e para a avaliação da eficácia terapêutica na sepse neonatal (Chaudhry et al., 2013).

Já está descrito na literatura que a sepse é a principal causa de morbidade e mortalidade no período neonatal, e na sepse tardia, os sinais e sintomas normalmente são inespecíficos, estando associados à outras comorbidades e sendo decorrentes da contaminação por microrganismos hospitalares, devido à hospitalização prolongada, ao uso prolongado de

cateteres e de antibióticos, procedimentos invasivos e enterocolite necrotizante (Weiss et al., 2020; Levy, 2007; Basha et al., 2014; Camacho-Gonzalez et al., 2013).

A acurácia de mais de 170 biomarcadores já foi investigada para auxiliar no diagnóstico e prognóstico da sepse, na tentativa de desenvolver novas ferramentas para reduzir a morbimortalidade, bem como os custos associados ao sistema de saúde (Cohen et al., 2015; Kumar et al., 2015; Prucha et al., 2015; Samraj et al., 2013). No entanto, nenhum biomarcador provou ter um valor significativo na prática clínica, em grande parte devido à baixa confiabilidade diagnóstica e/ou prognóstica.

A sepse neonatal tardia, nos países desenvolvidos, é principalmente causada por *Staphylococcus* coagulase-negativa e *S. aureus* e as bactérias Gram-negativas incluindo *E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Serratia* estão associadas à cerca de um terço desses casos, porém com incidência de morte variando de 40 a 69% dos casos (Didier et al., 2012; Cohen-Wolkowicz et al., 2009; Camacho-Gonzalez et al., 2013).

No Brasil, bactérias Gram-negativas e *Staphylococcus aureus* ainda são os principais agentes de infecção em grande parte dos hospitais. Porém, em alguns hospitais brasileiros, a situação vem se modificando e se tornando semelhante à de países desenvolvidos, onde os *Staphylococcus* coagulase-negativa, como o *S. epidermidis*, são os principais agentes de infecções nas UTIN, e os fungos, como espécies de *Candida* vêm apresentando um destaque cada vez maior (Brasil, Ministério da Saúde, 2014). Nosso estudo corrobora com os achados acima, pois encontramos mais casos de sepse por bactérias Gram-positivas em relação às Gram-negativas.

Em neonatos, a sepse causada por fungos é mais prevalente nos casos com hospitalização em longo prazo devido à prematuridade (Odabasi et al., 2020). A incidência de sepse fúngica é inversamente proporcional à idade gestacional e ao peso de nascimento, variando entre 10% e 28% nos menores de 1.000g (Moreira, 2005). Os RN com muito baixo peso ao nascer são colonizados mais frequentemente por *Candida* do que RN com peso de nascimento superior a 1.500g (Fanaroff et al., 1998), o que dificultou a coleta de casos para nosso trabalho e, portanto, esse grupo não foi incluído na nossa casuística.

Nos dados demográficos, clínicos e hematológicos, o parâmetro idade no diagnóstico foi mais alto nos grupos de sepse, porém significante somente no grupo sepse por Gram-negativos em relação aos controles, assim como os outros parâmetros significativamente alterados já esperados em um quadro de infecção como PCR, neutrófilos imaturos e índice neutrofílico. Os RN com sepse são mais velhos provavelmente devido ao prolongamento do tempo de internação, pois estes são internados devido à outra doença ou condição ao nascimento e a permanência na CTIN aumenta a suscetibilidade à infecção. Já está descrito que neutrófilos circulantes imaturos aparecem no sangue periférico em resposta à infecção e o índice neutrofílico é um parâmetro útil para o diagnóstico e monitoramento da infecção (Shen et al., 2017).

Embora já tenha sido relatado que algumas citocinas apresentam valores preditivos negativos elevados, estas dosagens ainda não foram adotadas para uso médico geral e, até o momento, suas dosagens são somente utilizadas em projetos de pesquisa (Redondo et al., 2014). Isto pode ser atribuível às maiores quantidades de sangue necessárias, ao longo intervalo para os resultados e

aos custos envolvidos. Não surpreendentemente, têm sido feitas tentativas para o uso de parâmetros fisiológicos (Bhandari e Narang, 1992; Griffin et al., 2005), e índices hematológicos (Gonzalez et al., 2003; Okascharoen et al., 2005), associados aos perfis de citocinas (Smulian et al., 1997; Khassawneh et al., 2007; Turner et al., 2006) no momento da suspeita de sepse para identificar com precisão neonatos infectados. O hemograma e as contagens diferenciais de leucócitos têm especificidade relativamente baixa para o diagnóstico de sepse. A medida de imaturidade de neutrófilos pode melhorar o diagnóstico, mas sua medida subjetiva é problemática. Portanto, ainda persiste a necessidade de melhorar os indicadores de diagnóstico da sepse neonatal (Bhandari et al., 2008).

A IL-6, assim como a IL-8, é sintetizada por muitas células, como monócitos, células endoteliais e fibroblastos após estimulação com TNF- α e IL-1 β . É a maior indutora da síntese de proteínas de fase aguda no fígado, incluindo a PCR e fibrinogênio. Na maioria dos casos de sepse neonatal, a IL-6 aumenta rapidamente, muitas horas antes do aumento da PCR e diminui, dentro de 24 horas, para níveis indetectáveis, o que pode ter acontecido, em nosso projeto, com as amostras de RN com sepse por bactérias Gram-positivas. A meia-vida curta é decorrente da ligação da IL-6 a proteínas plasmáticas como a α 2-macroglobulina, *clearance* precoce no fígado e inibição por outras citocinas (Gourine et al., 2002; Gruys et al., 2005). Em contraste com a PCR, a IL-6 é um marcador bem precoce, mas os níveis se tornam normais mesmo quando a infecção se estende, levando a resultados falso-negativos quando a dosagem é feita mais tarde no curso da infecção. Isso talvez possa justificar a falta de expressão diferencial de seu gene, assim como

a hipoeexpressão de *CXCL8* (IL-8) no grupo de sepse causada por Gram-positivos, evidentemente em decorrência da expressão gênica anteceder a produção proteica. Não podemos, também, descartar problemas com a sonda utilizada na técnica, uma vez que seu gene não apresentou expressão diferencial em nenhum dos grupos, nem nos diferentes tempos de coleta.

A dosagem simultânea de PCR e IL-6 pode prevenir este problema, pois o aumento dos níveis de PCR no plasma ocorre de 12 a 48 horas após o início da infecção, em um momento que os níveis de IL-6 provavelmente já decaíram. A dosagem combinada destes dois marcadores apresenta uma sensibilidade alta em crianças infectadas em qualquer período pós-natal (Chirico e Loda, 2011).

A IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória, secretada por uma variedade de células incluindo células T reguladoras. Essa citocina controla a inflamação, protegendo tecidos e órgãos de lesões inflamatórias (Xia et al., 2007) e sua maior concentração observada no grupo de sepse por Gram-negativos no dia do diagnóstico não foi significativa. Devemos levar em conta também o número de pacientes utilizados para nossa casuística, pois embora ele esteja adequado para avaliar a expressão por RNA-Seq (Kvan et al., 2012), ele é reduzido para avaliar concentração sérica de alguns parâmetros laboratoriais, não permitindo a visualização de algumas diferenças estatísticas.

Interessantemente, observamos uma hipoeexpressão do gene *FOXP3* no dia 3 em relação ao dia 7 do grupo de sepse clínica, que se correlaciona com uma maior concentração de IL-10 no dia 7 desse mesmo grupo (não significativa). As células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺CD127⁻Foxp3⁺), que são responsáveis pelo controle da resposta imune adaptativa e as principais

produtoras de IL-10, são induzidas à diferenciação pela *Forkhead box protein P3* conhecida como Foxp3, proteína codificada pelo gene *FOXP3*. Já foi descrito, que a imunossupressão persistente após a sepse pode ser a causa principal da morte de pacientes sépticos (Xu et al., 2020) e o grupo de sepse clínica apresentou 2 dos 4 óbitos que tivemos em nossa casuística, corroborando com a hipótese de imunossupressão pós-sepse.

No presente estudo, também observamos a hipoexpressão de *IL12B* no dia 0 em relação ao dia 7 pós-diagnóstico nos grupos de sepse causada por bactérias Gram-positivas e negativas. A Interleucina 12 (IL-12) é produzida por células apresentadoras de antígeno, macrófagos e células dendríticas, na presença de componentes microbianos ou pela ligação ao CD40 na superfície celular. A IL-12 estimula a produção de IFN- γ e TNF- α por linfócitos T e células NK. O IFN- γ , por sua vez, aumenta a liberação de IL-12, induzindo um *feedback* positivo, mecanismo crucial para a diferenciação de células Th1, assim como ativação da fagocitose (Novotny et al., 2006).

Dos 118 genes analisados da via do fator de transcrição NF- κ B, os transcritos que apresentaram expressão diferencial, segundo os bancos de dados utilizados, codificam diversas proteínas, tais como, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, enzimas, imunorreceptores, proteínas de fase aguda, fatores de transcrição e seus moduladores, proteínas da cascata de sinalização intracelular ou de apoptose e estão envolvidos em diferentes processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares que participam, principalmente, da regulação da via de sinalização do NF- κ B, ou atividade de citocinas e ligação aos seus receptores e do lúmen do grânulo terciário dos neutrófilos.

Na comparação entre os grupos, podemos observar o maior número de genes diferencialmente expressos no grupo de sepse por bactérias Gram-negativas em relação aos controles (22 DEG), em sua maioria hipoexpressos e apenas 5 hiperexpressos, seguido do grupo de sepse clínica com 12 genes, em sua maioria hipoexpressos, e do grupo de sepse por Gram-positivos com 11 genes distribuídos mais homoganeamente, reforçando a hipótese de um quadro que apresenta menor alteração dos marcadores inflamatórios, porém com períodos de internação mais prolongados (Dickson e Lehmann, 2019). A sepse por bactérias Gram-negativas já está descrita como responsável por maior gravidade nos casos de sepse e uma maior taxa de mortalidade em alguns países em desenvolvimento (Camacho-Gonzalez et al., 2013; Abdellatif et al., 2019). Já foi demonstrado na literatura que os RN apresentam uma maior proporção de genes hipoexpressos em relação às crianças com maior idade (Wynn et al., 2011).

No grupo sepse comprovada por bactérias Gram-negativas observamos a hiperexpressão do gene *CCL22*, que codifica a quimiocina CCL22, secretada por macrófagos, células dendríticas, células B e T. Essa quimiocina é induzida por LPS, presente na membrana externa das bactérias Gram-negativas e por algumas citocinas como IL-4 e IL-13, vias essas representadas no banco de dados *KEGG* deste grupo (Yoshie et al., 2015). Nesse mesmo grupo, também foi evidenciada a hiperexpressão do gene *IFNB1*, que codifica o Interferon tipo 1, incluindo IFN- α e IFN- β , que são citocinas que participam da resposta imune inata, impedindo a replicação viral (González-Navajas et al., 2012). Isso sugere uma contaminação cruzada com vírus, que poderia ter potencializado a gravidade dos casos.

É interessante que no banco de dados *REACTOME* as vias de sinalização de IL-4 e IL-13 apareceram nos dois grupos de sepse comprovada. IL-4 é uma citocina envolvida na diferenciação de células T auxiliares *naive* em células Th2 e troca de isotipo de imunoglobulina (Nelms et al., 1999), sendo considerada uma citocina crucial nas condições alérgicas e imunidade contra parasitas e, portanto, não é esperado seu envolvimento na patofisiologia da sepse. Entretanto, outros efeitos moduladores da IL-4 no sistema imune adaptativo sugerem que ela poderia desempenhar um papel na patogênese do choque séptico, incluindo prevenção da apoptose de linfócitos, modulação da adesão de leucócitos, aumento da expressão de MHC de classe II e de CD23, um receptor de lectina tipo C envolvido no reconhecimento de α -manana e β -glucana da parede celular de *C. albicans* ou *Aspergillus fumigatus* (Wong et al., 2009; Guo et al., 2018).

Assim como a IL-4, a IL-13 é uma citocina secretada por células Th2 importante na inflamação e doença alérgica, que compartilha com IL-4 um receptor celular comum, o receptor IL-4 tipo 1, assim, apresentando muitas semelhanças com IL-4 na resposta anti-inflamatória (Callard et al., 1996). Em modelos animais, IL-13 promove o aumento da sobrevivência dos monócitos e a expressão do MHC classe II e CD23 e na sepse e choque em humanos, se correlaciona com a expressão do TNF- α , mas seu efeito nas moléculas de HLA-DR de classe II ainda precisa ser esclarecido (Collighan et al., 2004; Chaudhry et al., 2013).

Vários biomarcadores são descritos na fisiopatologia da sepse, incluindo as metaloproteinases (MMP), nomeadas de acordo com sua capacidade de degradar proteínas da matriz extracelular e chamadas de gelatinases (MMP-

2/9), colagenases (MMP-1/8/13), estromelisinases (MMP-3/10/11), entre outras, mas também são capazes de degradar a superfície celular e moléculas intracelulares (Vandooren et al., 2013).

A metaloproteinase-9 da matriz (MMP-9), especificamente, apresenta níveis de expressão do mRNA e da proteína significativamente maiores em pacientes com sepse em comparação com indivíduos saudáveis e seus níveis de expressão têm sido apontados como biomarcadores de prognóstico na sepse (Lu et al., 2018; Park et al., 2018). A MMP-9, ou gelatinase B, é uma proteinase dependente de zinco liberada por várias células inflamatórias, predominantemente por neutrófilos e macrófagos, que participa da regulação proteolítica da matriz intra e extracelular e está envolvida em vários processos, como a exacerbação imunológica, quimiotaxia e angiogênese (Vandooren et al., 2013). Em nossos resultados, esse gene apresentou uma hiperexpressão em todos os grupos de sepse em relação aos controles com um valor de *Fold Change* maior no grupo de sepse por Gram-negativos. É surpreendente que a MMP-9 solúvel dosada por ELISA, acompanhou a expressão gênica diferencial, mostrando níveis proteicos mais altos nos três grupos de sepse em relação aos controles e validando funcionalmente, portanto, a expressão gênica.

Muitos genes diferencialmente expressos no presente trabalho estão relacionados com os neutrófilos, principalmente porque essas células estão em número alterado no sangue total em quadros inflamatórios, observado no nosso trabalho no grupo de Gram-positivos e grupo de sepse clínica, então possivelmente a maior expressão de MMP9 provém dessas células, que servem como estoque de metaloproteinases presentes nos grânulos terciários,

que são mieloperoxidase (MPO)-negativos e apresentam poucas proteínas antimicrobicas (Borregaard, 2010; Carman et al., 2007).

No estudo de Qiao e cols. (2021) foi mostrado um perfil de expressão gênica diferencial abrangente baseado na análise de casos de sepse pediátrica. Dos 577 DEG, foram selecionados os 50 genes mais significantes e, por meio de um modelo de previsão de regressão logística, foram identificados os 5 genes primários, que foram *TLR2*, *MMP9*, *TLR8*, *MPO* e *CCL5*. Entretanto, dois genes-alvo potenciais, *MMP9* e *MPO* com potencial de predição de sepse pediátrica foram utilizados e aprovados pelos resultados dos dados clínicos, que demonstraram a tendência de alteração destes dois biomarcadores nos pacientes. Este estudo utilizou a validação funcional pelo método de ELISA e revelou que à medida que a gravidade da sepse pediátrica aumentou, os níveis proteicos de MMP9 e MPO diminuíram significativamente.

O gene *CXCL2* foi o único que apresentou uma hipoexpressão em todos os grupos de sepse em relação aos controles. No início da infecção, a quimiocina CXCL2 (do inglês *C-X-X motif ligand 2*), também conhecida como Proteína Inflamatória de Macrófagos-2 (MIP-2), juntamente com CXCL1, leucotrieno B4 e IL-8 (CXCL8) atua na rolagem dos leucócitos, induzindo a ligação estável entre as moléculas de adesão e gerando um gradiente de concentração que estimula a transmigração de neutrófilos da corrente sanguínea para o local da infecção (Furze e Rankin, 2008). Os resultados de expressão gênica derivados de vários modelos animais de lesão pulmonar aguda identificaram vários genes candidatos, 85% deles com hiperregulação, entre eles o *CXCL2*, envolvidos no desenvolvimento dessa condição e que são comuns a outros modelos de estresse pulmonar, como a sepse (Grigoryev et

al., 2004). Diferentes estudos em modelos murinos têm demonstrado que a diminuição da expressão de CXCL2, por meio de glicocorticoides, leva à redução da resposta inflamatória e lesão (Schramm e Thorlacius, 2003) ou, por outro lado, o aumento da sua expressão, em humanos, decorrente de polimorfismo, aumenta a suscetibilidade à sepse (Flores et al., 2006).

O gene *MBL2*, validado funcionalmente pelo ensaio imunoenzimático, apresentou uma hiperexpressão nos grupos de sepse causada por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, assim como foi observada uma maior concentração da sua proteína nesses mesmos grupos. A MBL (do inglês *Mannose-Binding Lectin*) plasmática se liga a estruturas de carboidratos na superfície de uma ampla gama de microrganismos e ativa a via das lectinas do sistema complemento, também promovendo a opsonização e aumento da fagocitose, portanto com um papel crucial na defesa imune inata e, em RN, isso se torna particularmente importante, devido à imaturidade fisiológica do sistema imune adaptativo nesse período (de Benedetti et al., 2007). Já foi descrita como marcador para prever sepse, choque séptico e de prognóstico em RN (Dzwonek et al., 2008; Wahab Mohamed e Saeed, 2012).

No grupo de sepse clínica, não foi detectada expressão diferencial do gene *MBL2* e os níveis proteicos foram equivalentes aos controles, mas neste grupo, por outro lado, podemos ver a hiperexpressão do gene *IRF1*, no dia 0 comparado ao dia 3. Este gene, que codifica a proteína fator regulador de Interferon-1 (IRF-1), é responsável por promover a resposta antiviral (Kuriakose et al., 2018), não descartando a possibilidade de haver uma infecção viral ou, até mesmo, bacteriana em alguns dos casos que compõem este grupo. Tanto os Interferons do tipo I (IFN-I), quanto os fatores reguladores de Interferon

(IRF) são bem caracterizados em infecções virais, porém muito menos estudados nas vias dos receptores *Toll-like* (TLR), ativados por bactérias. Foi demonstrada em macrófagos murinos, a ativação de IRF2 por ácido lipoteicoico (LTA) de *Staphylococcus aureus*, resultando em uma regulação positiva de IRF1 e rápida secreção de IFN- α e, portanto, concluiu-se que os IRF podem ser fatores de intersecção de respostas virais e bacterianas em vias de sinalização de TLR (Liljeroos et al., 2008). Outro estudo demonstrou que a sepse pode ser diferenciada de SIRS (síndrome da resposta inflamatória sistêmica, sem infecção) pelo aumento da expressão de muitos genes envolvidos na resposta imunológica, de defesa e apoptose (Tsalik et al., 2014).

O grupo de sepse clínica também apresentou hipoexpressão do gene *ESM1* em relação aos controles. Estudos *in vitro* mostraram que as citocinas IL-1 β e TNF- α regulam o RNAm do *ESM1*, também chamado de endocan, induzindo sua secreção pelas células endoteliais, o que pode torná-lo útil como um biomarcador solúvel para o diagnóstico de sepse (Zonda et al., 2019). O endocan é considerado uma molécula protetora que regula a migração de leucócitos para o foco inflamatório, bem como sua adesão e ativação reduzindo, assim, o dano ao tecido por diapedese excessiva. Também foi observada uma correlação entre os níveis de endocan e a gravidade da sepse em pacientes adultos e em sepse neonatal precoce (Mihajlovic et al., 2014; Zonda et al., 2019).

Na análise de expressão gênica como marcador de prognóstico, tivemos a surpreendente revelação de um único gene hiperexpresso dos 36 DEG. O gene *TREM1* também apresentou uma hiperexpressão no dia 0 comparado aos dias 3 e 7 do grupo sepse causada por Gram-negativos. A hiperexpressão de

TREM1 também foi vista em outros estudos (Wynn et al., 2011; Raymond et al., 2017). Este gene codifica a proteína TREM-1, membro da superfamília das imunoglobulinas expressa em neutrófilos e monócitos/macrófagos. A ativação da via de TREM-1 resulta na degranulação dos neutrófilos e na potente produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8, MCP-1, IL-2, IL-12 e GM-CSF pelos monócitos, macrófagos e células dendríticas, aumentando a inflamação durante infecções por diferentes patógenos, como o vírus influenza, da hepatite C e, mais recentemente foi relatado também nos pacientes com sepse e COVID-19 (Sandquist e Wong, 2014; Da Silva Neto et al., 2020).

Na sepse, a expressão do TREM-1 encontra-se aumentada na sua forma solúvel e é liberado na circulação sanguínea, podendo ser usado como um marcador para sepse comprovada e sepse com cultura negativa em neonatos pré-termo e a termo (Adly et al., 2014). Outro estudo revelou que as metaloproteinases são capazes de liberar a proteína TREM-1 por meio de clivagens proteolíticas nos monócitos quando estimulados por LPS (Gómez-Pinã et al., 2007). Assim, o TREM-1 solúvel tem potencial como um excelente valor preditivo para choque séptico e morte (Arízaga-Ballesteros et al., 2015), confirmando nossos achados na expressão gênica do *TREM1* no presente estudo, também validado pela dosagem proteica de TREM-1 sérico.

Utilizamos a validação funcional pelo método de ELISA para comprovar através dos valores de concentração das dosagens séricas de algumas proteínas, os valores obtidos pela expressão gênica, pois existem na literatura estudos que avaliaram o perfil de expressão gênica em choque séptico

pediátrico utilizando a validação funcional por ELISA (Wong et al., 2007; Qiao et al., 2021).

O Fator Nuclear-*kappa* B (NF- κ B) foi escolhido no presente trabalho por consistir em uma família de fatores de transcrição que coordena a resposta inflamatória, tanto do sistema imune inato, quanto do adaptativo, sendo responsável pela diferenciação celular, proliferação e sobrevivência em quase todos os organismos multicelulares e seu papel na expressão gênica de diversos mediadores pró e anti-inflamatórios tem sido analisado em profundidade (Lee et al., 2014; Mitchell et al., 2016).

O sistema NF- κ B é rigidamente coordenado e sua desregulação, ou persistente ativação, tem sido associada a uma ampla gama de doenças que variam de câncer a processos inflamatórios e distúrbios imunológicos (Liang et al., 2018). Conforme já mencionado, a interação de PAMP bacterianos com os TLR resulta na dimerização do receptor que ativa a cascata de sinalização de várias proteínas como, TRAF-6, I κ B, NIK, p100, p50, RelA e RelB, que co-interagem, culminando na transcrição de genes pró e anti-inflamatórios (Vadillo e Pelayo, 2012). A via do NF- κ B pode ser ativada pela via canônica, mediada por RelA, ou pela não-canônica, ativada por NIK e RelB (Sun, 2011). A via canônica de ativação do NF- κ B ocorre em resposta à sinalização de TNF- α e IL-1 β e o resultado é a produção de fatores inflamatórios que influenciam diretamente na resposta imune inata (Lawrence, 2009). Com isso, a rede de regulação do NF- κ B e sua dinâmica oferecem uma infinidade de alvos terapêuticos já utilizados, como os corticosteroides e alguns promissores, como anticorpos neutralizantes, entre eles anti-IL10, anti-IL-17A, anti-TNF- α , anti-

IL1 β e proteína ligante de IL-18 que precisam ser mais explorados para serem utilizados na prática clínica (Chaudhry et al., 2013; Michell et al., 2016).

Por fim, os genes diferencialmente expressos detectados no presente trabalho revelaram potencial para serem analisados individualmente por técnicas mais simples, rápidas e menos custosas e, com isso, auxiliar no diagnóstico e avaliação da resposta ao tratamento com antibióticos na sepse neonatal tardia.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. A análise de expressão diferencial dos genes relacionados à via do NF- κ B mostrou o grupo de sepse causada por bactérias Gram-negativas com maior número de DEG e uma hiperexpressão dos genes *MMP9* em todos os grupos de sepse e *MBL2* na sepse comprovada por bactérias Gram-positivas e negativas em relação aos controles.

2. Para avaliação da resposta à antibioticoterapia por meio da expressão gênica podemos concluir que no dia 0, a hipoexpressão do gene *IL12B* nos grupos de sepse comprovada poderia ser utilizada como um marcador de diagnóstico, assim como a hipoexpressão do gene *MMP9* para o grupo de sepse causada por Gram-positivos e hiperexpressão de *TREM1* para o grupo de sepse causada por Gram-negativos. O grupo de sepse clínica apresentou um perfil diferente, com hiperexpressão de *IRF1*, sugerindo uma possível infecção viral ou bacteriana não detectada.

3. A hiperexpressão do gene *TREM1* no grupo que foi à óbito constitui um possível preditor de mau prognóstico para a sepse neonatal tardia.

Em conjunto, nossos resultados revelaram que os genes diferencialmente expressos *MMP9*, *MBL2* e *TREM1*, validados funcionalmente, que codificam proteínas importantes comprovadamente envolvidas na patogênese da sepse neonatal, apresentam potencial para serem utilizados como biomarcadores gênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdellatif M, Al-Khabori M, Rahman AU, Khan AA, Al-Farsi A, Ali K. Outcome of Late-onset Neonatal Sepsis at a Tertiary Hospital in Oman. *Oman Med J*. 2019;34(4):302-7.

Adly AA, Ismail EA, Andrawes NG, El-Saadany MA. Circulating soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) as diagnostic and prognostic marker in neonatal sepsis. *Cytokine*. 2014;65(2):184-91.

Agarwal A, Koppstein D, Rozowsky J, Sboner A, Habegger L, Hillier LW, et al. Comparison and calibration of transcriptome data from RNA-Seq and tiling arrays. *BMC Genomics*. 2010;11:383.

Alexander GR, Himes JH, Kaufman RB, Mor J, Kogan M. A United States national reference for fetal growth. *Obstet Gynecol*. 1996;87(2):163-8.

Anirudhan A, Paramasivam P, Murugesan R, Ahmed SSSJ. Temporal changes of NF- κ B signaling pathway genes in bacterial stimulated whole blood- a host mechanism associated with sepsis. *Microb Pathog*. 2020;147:104415.

Arízaga-Ballesteros V, Alcorta-García MR, Lázaro-Martínez LC, Amézquita-Gómez JM, Alanís-Cajero JM, Villela L, et al. Can sTREM-1 predict septic shock & death in late-onset neonatal sepsis? A pilot study. *Int J Infect Dis*. 2015;30:27-32.

Arkader R, Troster EJ, Lopes MR, Júnior RR, Carcillo JA, Leone C, et al. Procalcitonin does discriminate between sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *Arch Dis Child*. 2006;91(2):117-20.

Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Walsman BL, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr*. 1991;119(3):417-23.

Bhandari V, Narang A. Thermoregulatory alterations as a marker for sepsis in normothermic premature neonates. *Indian Pediatr*. 1992;29:571-5.

Bhandari V, Wang C, Rinder C, Rinder H. Hematologic profile of sepsis in neonates: neutrophil CD64 as a diagnostic marker. *Pediatrics*. 2008 Jan;121(1):129-34.

Basha S, Surendran N, Pichichero M. Immune responses in neonates. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(9):1171-84.

Benitz WE. Adjunct laboratory tests in the diagnosis of early-onset neonatal sepsis. *Clin Perinatol*. 2010;37(2):421-38.

Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657-70.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Atenção à saúde do recém-nascido: guia para os profissionais de saúde. 2. ed. atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. p. 164.

Bu L, Wang ZW, Hu SQ, Zhao WJ, Geng XJ, Zhou T, et al. Identification of Key mRNAs and lncRNAs in Neonatal Sepsis by Gene Expression Profiling. *Comput Math Methods Med*. 2020;2020:8741739.

Callard RE, Matthews DJ, Hibbert L. IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same? *Immunol Today*. 1996;17(3):108-10.

Camacho-Gonzalez A, Spearman PW, Stoll BJ. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. *Pediatr Clin North Am*. 2013;60(2):367-89.

Caneparo V, Landolfo S, Gariglio M, De Andrea M. The Absent in Melanoma 2-Like Receptor IFN-Inducible Protein 16 as an Inflammasome Regulator in Systemic Lupus Erythematosus: The Dark Side of Sensing Microbes. *Front Immunol*. 2018;9:1180.

Capurro H, Konichezky S, Fonseca D, Caldeyro-Barcia R. A simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. *J Pediatr*. 1978;93(1):120-2.

Carman CV, Sage PT, Sciuto TE, de la Fuente MA, Geha RS, Ochs HD, et al. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity*. 2007;26(6):784-97.

Ceccon ME, Vaz FA, Diniz EM, Okay TS. [Interleukins 6 and C-reactive protein for the diagnosis of late onset sepsis in the newborn infant]. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2006;52(2):79-85.

Celes MR, Prado CM, Rossi MA. Sepsis: going to the heart of the matter. *Pathobiology*. 2013;80(2):70-86.

Cernada M, Serna E, Bauerl C, Collado MC, Pérez-Martínez G, Vento M. Genome-wide expression profiles in very low birth weight infants with neonatal sepsis. *Pediatrics*. 2014;133(5):e1203-11.

Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, Ali MM, McGuire F, Nagarkatti PS, et al. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo*. 2013;27(6):669-84.

Chirico G, Loda C. Laboratory aid to the diagnosis and therapy of infection in the neonate. *Pediatr Rep.* 2011;3(1):e1.

Cianciarullo MA, Costa IDC, Esther M Ceccon J, Krebs VLJ. Novos X Antigos Marcadores de Infecção no diagnóstico de sepse neonatal: visão crítica. *Pediatrics São Paulo.* 2008;30(2):107-17.

Cildir G, Low KC, Tergaonkar V. Noncanonical NF- κ B Signaling in Health and Disease. *Trends Mol Med.* 2016;22(5):414-29.

Cohen J, Vincent JL, Adhikari NK, Machado FR, Angus DC, Calandra T, et al. Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(5):581-614.

Cohen-Wolkowicz M, Moran C, Benjamin DK, Cotten CM, Clark RH, Smith PB. Early and late onset sepsis in late preterm infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(12):1052-6.

Collighan N, Giannoudis PV, Kourgeraki O, Perry SL, Guillou PJ, Bellamy MC. Interleukin 13 and inflammatory markers in human sepsis. *Br J Surg.* 2004;91(6):762-8.

Cuenca AG, Wynn JL, Moldawer LL, Levy O. Role of innate immunity in neonatal infection. *Am J Perinatol.* 2013;30(2):105-12.

Da Silva Neto PV, Carvalho JCS, Pimentel VE, Pérez MM, Carmona-Garcia I, Neto NT, et al. Prognostic value of sTREM-1 in COVID-19 patients: a biomarker for disease severity and mortality. *MedRxiv.* 2020.

Da Silva O, Ohlsson A, Kenyon C. Accuracy of leukocyte indices and C-reactive protein for diagnosis of neonatal sepsis: a critical review. *Pediatr Infect Dis J.* 1995;14(5):362-6.

de Benedetti F, Auriti C, D'Urbano LE, Ronchetti MP, Ravà L, Tozzi A, et al. Low serum levels of mannose binding lectin are a risk factor for neonatal sepsis. *Pediatr Res.* 2007;61(3):325-8.

Delanghe JR, Speeckaert MM. Translational research and biomarkers in neonatal sepsis. *Clin Chim Acta.* 2015;451(Pt A):46-64.

Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med.* 2008;36(1):296-327.

Dickson K, Lehmann C. Inflammatory Response to Different Toxins in Experimental Sepsis Models. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18).

Didier C, Streicher MP, Chognot D, Campagni R, Schnebelen A, Messer J, et al. Late-onset neonatal infections: incidences and pathogens in the era of antenatal antibiotics. *Eur J Pediatr*. 2012;171(4):681-7.

Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15-21.

Dzwonek AB, Neth OW, Thiébaud R, Gulczynska E, Chilton M, Hellwig T, et al. The role of mannose-binding lectin in susceptibility to infection in preterm neonates. *Pediatr Res*. 2008;63(6):680-5.

Emr BM, Alcamo AM, Carcillo JA, Aneja RK, Mollen KP. Pediatric Sepsis Update: How Are Children Different? *Surg Infect (Larchmt)*. 2018;19(2):176-83.

Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016;32(19):3047-8.

Fanaroff AA, Korones SB, Wright LL, Verter J, Poland RL, Bauer CR, et al. Incidence, presenting features, risk factors and significance of late onset septicemia in very low birth weight infants. The National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *Pediatr Infect Dis J*. 1998;17(7):593-8.

Fleischmann C, Reichert F, Cassini A, Horner R, Harder T, Markwart R, et al. Global incidence and mortality of neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child*. 2021.

Flores C, Maca-Meyer N, Pérez-Méndez L, Sangüesa R, Espinosa E, Muriel A, et al. A CXCL2 tandem repeat promoter polymorphism is associated with susceptibility to severe sepsis in the Spanish population. *Genes Immun*. 2006;7(2):141-9.

França EB, Lansky S, Rego MAS, Malta DC, França JS, Teixeira R, et al. Leading causes of child mortality in Brazil, in 1990 and 2015: estimates from the Global Burden of Disease study. *Rev Bras Epidemiol*. 2017;20Suppl 01(Suppl 01):46-60.

Furze RC, Rankin SM. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*. 2008;125(3):281-8.

Garber M, Grabherr MG, Guttman M, Trapnell C. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nat Methods*. 2011;8(6):469-77.

GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1859-922.

Goldstein B, Giroir B, Randolph A, Sepsis ICCoP. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*. 2005;6(1):2-8.

Gómez-Piña V, Soares-Schanoski A, Rodríguez-Rojas A, Del Fresno C, García F, Vallejo-Cremades MT, et al. Metalloproteinases shed TREM-1 ectodomain from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *J Immunol*. 2007;179(6):4065-73.

Gonzalez BE, Mercado CK, Johnson L, Brodsky NL, Bhandari V. Early markers of late-onset sepsis in premature neonates: clinical, hematological and cytokine profile. *J Perinat Med*. 2003;31:60–68.

González-Navajas JM, Lee J, David M, Raz E. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(2):125-35.

Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ*. 2016;353:i1585.

Gourine AV, Gourine VN, Tesfaigzi Y, Caluwaerts N, Van Leuven F, Kluger MJ. Role of alpha(2)-macroglobulin in fever and cytokine responses induced by lipopolysaccharide in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;283(1):R218-26.

Griffin MP, Lake DE, Bissonette EA, Harrell FE Jr, O'Shea TM, Moorman JR. Heart rate characteristics: novel physiomarkers to predict neonatal infection and death. *Pediatrics*. 2005;116: 1070–74.

Griffith M, Walker JR, Spies NC, Ainscough BJ, Griffith OL. Informatics for RNA Sequencing: A Web Resource for Analysis on the Cloud. *PLoS Comput Biol*. 2015;11(8):e1004393.

Grigoryev DN, Finigan JH, Hassoun P, Garcia JG. Science review: searching for gene candidates in acute lung injury. *Crit Care*. 2004;8(6):440-7.

Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2005;6(11):1045-56.

Guo Y, Chang Q, Cheng L, Xiong S, Jia X, Lin X, et al. C-Type Lectin Receptor CD23 Is Required for Host Defense against. *J Immunol*. 2018;201(8):2427-40.

Instituto Latino-Americano para Estudos da Sepse. Sepse: um problema de saúde pública / Instituto Latino-Americano para Estudos da Sepse. Brasília: CFM, 2015. 90 p.

Israëls J, Frakking FN, Kremer LC, Offringa M, Kuijpers TW, van de Wetering MD. Mannose-binding lectin and infection risk in newborns: a systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2010;95(6):F452-61.

Jacquot A, Labaune JM, Baum TP, Putet G, Picaud JC. Rapid quantitative procalcitonin measurement to diagnose nosocomial infections in newborn infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2009;94(5):F345-8.

Khatoon Z, Figler B, Zhang H, Cheng F. Introduction to RNA-Seq and its applications to drug discovery and development. *Drug Dev Res.* 2014;75(5):324-30.

Klingenberg C, Kornelisse RF, Buonocore G, Maier RF, Stocker M. Culture-Negative Early-Onset Neonatal Sepsis - At the Crossroad Between Efficient Sepsis Care and Antimicrobial Stewardship. *Front Pediatr.* 2018;6:285.

Kumar R, Chaudhari D, Kumar R. Biomarkers of sepsis: recent advancements. *Apollo Med.* 2015;12(4):239-242.

Kumolosasi E, Salim E, Jantan I, Ahmad W. Kinetics of Intracellular, Extracellular and Production of Pro-Inflammatory Cytokines in Lipopolysaccharide-Stimulated Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 2014;13(4):536-43.

Kuriakose T, Zheng M, Neale G, Kanneganti TD. IRF1 Is a Transcriptional Regulator of ZBP1 Promoting NLRP3 Inflammasome Activation and Cell Death during Influenza Virus Infection. *J Immunol.* 2018;200(4):1489-95.

Kvan VM, Liu P, Si Y. A comparison of statistical methods for detecting differentially expressed genes from RNA-seq data. *Am J Bot.* 2012 Feb;99(2):248-56.

Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(6):a001651.

Laxminarayan R, Matsoso P, Pant S, Brower C, Røttingen JA, Klugman K, et al. Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *Lancet.* 2016;387(10014):168-75.

Leante-Castellanos JL, de Guadiana-Romualdo LG, Fuentes-Gutiérrez C, Hernando-Holgado A, García-González A, Jiménez-Santos E. The value of lipopolysaccharide binding protein for diagnosis of late-onset neonatal sepsis in very low birth weight infants. *J Perinat Med.* 2015;43(2):253-7.

Lee RE, Walker SR, Savery K, Frank DA, Gaudet S. Fold change of nuclear NF- κ B determines TNF-induced transcription in single cells. *Mol Cell*. 2014;53(6):867-79.

Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(5):379-90.

Liang H, Yang X, Liu C, Sun Z, Wang X. Effect of NF- κ B signaling pathway on the expression of MIF, TNF- α , IL-6 in the regulation of intervertebral disc degeneration. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2018;18(4):551-6.

Liljeroos M, Vuolteenaho R, Rounioja S, Henriques-Normark B, Hallman M, Ojaniemi M. Bacterial ligand of TLR2 signals Stat activation via induction of IRF1/2 and interferon-alpha production. *Cell Signal*. 2008;20(10):1873-81.

Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550.

Lu X, Xue L, Sun W, Ye J, Zhu Z, Mei H. Identification of key pathogenic genes of sepsis based on the Gene Expression Omnibus database. *Mol Med Rep*. 2018;17(2):3042-54.

Machado JR, Soave DF, da Silva MV, de Menezes LB, Etchebehere RM, Monteiro ML, et al. Neonatal sepsis and inflammatory mediators. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:269681.

Madonna G, Ullman CD, Gentilcore G, Palmieri G, Ascierto PA. NF- κ B as potential target in the treatment of melanoma. *J Transl Med*. 2012;10:53.

Magrini L, Gagliano G, Travaglino F, Vetrone F, Marino R, Cardelli P, et al. Comparison between white blood cell count, procalcitonin and C reactive protein as diagnostic and prognostic biomarkers of infection or sepsis in patients presenting to emergency department. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(10):1465-72.

Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *MBnet.journal*. 2011;17(1),10-12.

Mathai E, Christopher U, Mathai M, Jana AK, Rose D, Bergstrom S. Is C-reactive protein level useful in differentiating infected from uninfected neonates among those at risk of infection? *Indian Pediatr*. 2004;41(9):895-900.

Matsuda A, Jacob A, Wu R, Aziz M, Yang WL, Matsutani T, et al. Novel therapeutic targets for sepsis: regulation of exaggerated inflammatory responses. *J Nippon Med Sch*. 2012;79(1):4-18.

- Meireles LA, Vieira AA, Costa CR. Avaliação do diagnóstico da sepse neonatal: uso de parâmetros laboratoriais e clínicos como fatores. *Rev Esc Enferm USP*. 2011;45(1):33-9.
- Mihajlovic DM, Lendak DF, Brkic SV, Draskovic BG, Mitic GP, Novakov Mikic AS, et al. Endocan is useful biomarker of survival and severity in sepsis. *Microvasc Res*. 2014;93:92-7.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 426 p.
- Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016;8(3):227-41.
- Moreira MEL. Controversies about the management of invasive fungal infections in very low birth weight infants. *Jornal de Pediatria*. 2005;81(1 suppl 1):S52-S8.
- Mostafa MS, Mounir ZM, Waheed H, et al. Serum amyloid A an early diagnostic marker for neonatal sepsis. *Life Sci J*. 2011;8:271–7
- Nedeva C, Menassa J, Puthalakath H. Sepsis: Inflammation Is a Necessary Evil. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:108.
- Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:701-38.
- Ng PC, Lam HS. Biomarkers for late-onset neonatal sepsis: cytokines and beyond. *Clin Perinatol*. 2010;37(3):599-610.
- Novotny AR, Emmanuel K, Ulm K, Bartels H, Siewert JR, Weighardt H, et al. Blood interleukin 12 as preoperative predictor of fatal postoperative sepsis after neoadjuvant radiochemotherapy. *Br J Surg*. 2006;93(10):1283-9.
- Nowrousian M. Next-generation sequencing techniques for eukaryotic microorganisms: sequencing-based solutions to biological problems. *Eukaryot Cell*. 2010;9(9):1300-10.
- Odabasi IO, Bulbul A. Neonatal Sepsis. *Sisli Etfal Hastan Tip Bul*. 2020;54(2):142-58.
- Okascharoen C, Sirinavin S, Thakkestian A, Kitayaporn D, Supapanachart S. A bedside prediction-scoring model for late onset neonatal sepsis. *J Perinatol*. 2005;25:778–783.

Park H, Park KH, Kim YM, Kook SY, Jeon SJ, Yoo HN. Plasma inflammatory and immune proteins as predictors of intra-amniotic infection and spontaneous preterm delivery in women with preterm labor: a retrospective study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2018;18(1):146.

Pertea M, Kim D, Pertea GM, Leek JT, Salzberg SL. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat Protoc*. 2016;11(9):1650-67.

Pettilä V, Hynninen M, Takkunen O, Kuusela P, Valtonen M. Predictive value of procalcitonin and interleukin 6 in critically ill patients with suspected sepsis. *Intensive Care Med*. 2002;28(9):1220-5.

Pinheiro RdS, Ferreira LCdL, Brum IR, Guilherme JP, Monte RL. Study of maternal risk factors associated with early-onset neonatal sepsis in a tertiary hospital of the Brazilian Amazonia. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2007;29(8):387-95.

Prucha M, Bellingan G, Zazula R. Sepsis biomarkers. *Clin Chim Acta*. 2015;440:97-103.

Qiao Y, Zhang B, Liu Y. Identification of Potential Diagnostic Gene Targets for Pediatric Sepsis Based on Bioinformatics and Machine Learning. *Front Pediatr*. 2021;9:576585.

Ramilo O, Allman W, Chung W, Mejias A, Ardura M, Glaser C, et al. Gene expression patterns in blood leukocytes discriminate patients with acute infections. *Blood*. 2007;109(5):2066-77.

Raymond SL, López MC, Baker HV, Larson SD, Efron PA, Sweeney TE, Khatri P, Moldawer LL, Wynn JL. Unique transcriptomic response to sepsis is observed among patients of different age groups. *PLoS One*. 2017;12(9):e0184159.

Redondo AC, Ceccon ME, Silveira-Lessa AL, Quinello C, Palmeira P, Carvalho WB, et al. TLR-2 and TLR-4 expression in monocytes of newborns with late-onset sepsis. *J Pediatr (Rio J)*. 2014;90(5):472-8.

Samraj RS, Zingarelli B, Wong HR. Role of biomarkers in sepsis care. *Shock*. 2013;40(5):358-65.

Sandquist M, Wong HR. Biomarkers of sepsis and their potential value in diagnosis, prognosis and treatment. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(10):1349-56.

Savinova OV, Hoffmann A, Ghosh G. The Nfkb1 and Nfkb2 proteins p105 and p100 function as the core of high-molecular-weight heterogeneous complexes. *Mol Cell*. 2009;34(5):591-602.

Schramm R, Thorlacius H. Staphylococcal enterotoxin B-induced acute inflammation is inhibited by dexamethasone: important role of CXC chemokines KC and macrophage inflammatory protein 2. *Infect Immun*. 2003;71(5):2542-7.

Shanley TP, Wong HR. Molecular genetics in the pediatric intensive care unit. *Crit Care Clin*. 2003;19(3):577-94.

Shen XF, Cao K, Jiang JP, Guan WX, Du JF. Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update. *J Cell Mol Med*. 2017;21(9):1687-97.

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801-10.

Smulian JC, Bhandari V, Campbell WA, Rodis JF, Vintzileos AM. Value of umbilical artery and vein levels of interleukin-6 and soluble intracellular adhesion molecule-1 as predictors of neonatal hematologic indices and suspected early sepsis. *J Matern Fetal Med*. 1997;6:254–259.

Sun SC. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res*. 2011;21(1):71-85.

Tang BM, Huang SJ, McLean AS. Genome-wide transcription profiling of human sepsis: a systematic review. *Crit Care*. 2010;14(6):R237.

Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol*. 2010;28(5):511-5.

Tsalik EL, Langley RJ, Dinwiddie DL, Miller NA, Yoo B, van Velkinburgh JC, et al. An integrated transcriptome and expressed variant analysis of sepsis survival and death. *Genome Med*. 2014;6(11):111.

Vadillo E, Pelayo R. [Toll-like receptors in development and function of the hematopoietic system]. *Rev Invest Clin*. 2012;64(5):461-76.

Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013;48(3):222-72.

Vaz FAC, Ceccon MEJ, Diniz EMA, Valderato F. Indicadores imunológicos (IgM e proteína C – reativa) nas infecções neonatais. *Ver Ass Med Brasil*. 1998;44(3):185-95.

- Wahab Mohamed WA, Saeed MA. Mannose-binding lectin serum levels in neonatal sepsis and septic shock. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25(4):411-4.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009;10(1):57-63.
- Weinberg GA, D'Angio CT. Laboratory aids for diagnosis of neonatal sepsis. In: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Nizet V, Maldonado YA. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant.* Philadelphia: WB Saunders; 2011. p. 1144-1160.
- Weiss SL, Peters MJ, Alhazzani W, Agus MSD, Flori HR, Inwald DP, et al. Surviving Sepsis Campaign International Guidelines for the Management of Septic Shock and Sepsis-Associated Organ Dysfunction in Children. *Pediatr Crit Care Med.* 2020;21(2):e52-e106.
- Wong HR, Cvijanovich N, Allen GL, Lin R, Anas N, Meyer K, et al. Genomic expression profiling across the pediatric systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock spectrum. *Crit Care Med.* 2009;37(5):1558-66.
- Wong HR, Shanley TP, Sakthivel B, Cvijanovich N, Lin R, Allen GL, et al. Genome-level expression profiles in pediatric septic shock indicate a role for altered zinc homeostasis in poor outcome. *Physiol Genomics.* 2007;30(2):146-55.
- Wu TW, Tabangin M, Kusano R, Ma Y, Ridsdale R, Akinbi H. The utility of serum hepcidin as a biomarker for late-onset neonatal sepsis. *J Pediatr.* 2013;162(1):67-71.
- Wynn JL, Cvijanovich NZ, Allen GL, Thomas NJ, Freishtat RJ, Anas N, et al. The influence of developmental age on the early transcriptomic response of children with septic shock. *Mol Med.* 2011;17(11-12):1146-56.
- Xia ZW, Xu LQ, Zhong WW, Wei JJ, Li NL, Shao J, et al. Heme oxygenase-1 attenuates ovalbumin-induced airway inflammation by up-regulation of foxp3 T-regulatory cells, interleukin-10, and membrane-bound transforming growth factor-1. *Am J Pathol.* 2007;171(6):1904-14.
- Xu J, Li J, Xiao K, Zou S, Yan P, Xie X, et al. Dynamic changes in human HLA-DRA gene expression and Th cell subsets in sepsis: Indications of immunosuppression and associated outcomes. *Scand J Immunol.* 2020;91(1):e12813.

Yoshie O, Matsushima K. CCR4 and its ligands: from bench to bedside. *Int Immunol*. 2015;27(1):11-20.

Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS*. 2012;16(5):284-7.

Zonda GI, Zonda R, Cernomaz AT, Paduraru L, Avasiloaiei, AL, Grigoriu, BD. Endocan – a potential diagnostic marker for early onset sepsis in neonates. *J Infect Dev Ctries* 2019; 13(4): 311-317.

APÊNDICES

Apêndice 1- Nomenclatura dos genes

ACTB- Gene Actin Beta

AKT1- Gene AKT Serine/Threonine Kinase 1

ALB- Gene Albumin

ALDOA- Gene Aldolase, Fructose-Bisphosphate A

ARHGDI1A- Gene Rho GDP Dissociation Inhibitor Alpha

ATF1- Gene Activating Transcription Factor 1

BCL10- Gene BCL10 Immune Signaling Adaptor

BCL2L1- Gene BCL2 Like 1

BCL3- Gene BCL3 Transcription Coactivator

BIRC2- Gene Baculoviral IAP Repeat Containing 2

BIRC3- Gene Baculoviral IAP Repeat Containing 3

C3- Gene Complement C3

CARD11- Gene Caspase Recruitment Domain Family Member 11

CASP1- Gene Caspase 1

CASP8- Gene Caspase 8

CCL11- Gene C-C Motif Chemokine Ligand 11

CCL2- Gene C-C Motif Chemokine Ligand 2

CCL22- Gene C-C Motif Chemokine Ligand 22

CCL5- Gene C-C Motif Chemokine Ligand 5

CCR5- Gene C-C Motif Chemokine Receptor 5

CD27- Gene CD27 Molecule

CD40- Gene *CD40 Molecule*

CD64- Gene Fc Fragment Of IgG Receptor Ia

CD69- Gene CD69 Molecule

CD80- Gene CD80 Molecule

CD83- Gene CD83 Molecule

CDKN1A- Gene Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A

CFLAR- Gene CASP8 And FADD Like Apoptosis Regulator

CHUK- Gene Component Of Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Complex

CSF1- Gene Colony Stimulating Factor 1

CSF2- Gene Colony Stimulating Factor 2

CSF3- Gene Colony Stimulating Factor 3

CX3CL1- Gene C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1

CXCL1- Gene C-X-C Motif Chemokine Ligand 1

CXCL10- Gene C-X-C Motif Chemokine Ligand 1

CXCL2- Gene C-X-C Motif Chemokine Ligand 2

CXCL9- Gene C-X-C Motif Chemokine Ligand 9

EGFR- Gene Epidermal Growth Factor Receptor

EGR1- Gene Early Growth Response 1

ELK1- Gene ETS Transcription Factor ELK1

ESM1- Gene Endothelial Cell Specific Molecule 1

FASLG- Gene Fas Ligand

FOS- Gene Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit

FOXP3- Gene Forkhead Box P3

GADD45B- Gene Growth Arrest And DNA Damage Inducible Beta

GAPDH- Gene Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

HAMP- Gene Hepcidin Antimicrobial Peptide

HMBS- Gene Hydroxymethylbilane Synthase

HMOX1- Gene Heme Oxygenase 1

HPRT1- Gene Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1

ICAM1- Gene Intercellular Adhesion Molecule 1

IFNA1- Gene Interferon Alpha 1

IFNB1- Gene Interferon Beta 1

IFNG- Gene Interferon Gamma

IKBKE- Gene Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Epsilon

IKBKG- Gene Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Regulatory Subunit Gamma

IL10- Gene Interleukin 10

IL12B- Gene Interleukin 12B

IL15- Gene Interleukin 15

IL18- Gene Interleukin 18

IL1B- Gene Interleukin 1 Beta

IL1R1- Gene Interleukin 1 Receptor Type 1

IL1RN- Gene Interleukin 1 Receptor Antagonist

IL2- Gene Interleukin 2

IL27- Gene Interleukin 27

IL33- Gene Interleukin 33

IL6- Gene Interleukin 6

IL8-Gene C-X-C Motif Chemokine Ligand 8

IPO8- Gene Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1

IRAK1- Gene Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 1

IRAK2- Gene Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 2

IRF1- Gene Interferon Regulatory Factor 1

LTBR- Gene Lymphotoxin Beta Receptor

MALT1- Gene MALT1 Paracaspase

MAP2K6- Gene Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 6

MAP3K1- Gene Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 1

MBL2- Gene Mannose Binding Lectin 2

MMP9- Gene Matrix Metallopeptidase 9

MYC- Gene MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor

MYD88- Gene MYD88 Innate Immune Signal Transduction Adaptor

NFKB1- Gene Nuclear Factor Kappa B Subunit 1

NFKB2- Gene Nuclear Factor Kappa B Subunit 2

NFKBIA- Gene NFKB Inhibitor Alpha

NFKBIB- Gene NFKB Inhibitor Beta

NFKBIE- Gene NFKB Inhibitor Epsilon

NR4A2- Gene Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 2

PDGFB- Gene Platelet Derived Growth Factor Subunit B

PGK1- Gene Phosphoglycerate Kinase 1

PLAU- Gene Plasminogen Activator, Urokinase

PTGS2- Gene Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2

PYCARD- Gene PYD And CARD Domain Containing

RAF1- Gene Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase

REL- Gene REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit

RELA- Gene RELA Proto-Oncogene, NF-KB Subunit

RELB- Gene RELB Proto-Oncogene, NF-KB Subunit

RHOA- Gene Ras Homolog Family Member A

RIPK1- Gene Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 1

RPL11- Gene Ribosomal Protein L11

RPL19- Gene Ribosomal Protein L19

RPL32- Gene Ribosomal Protein L32

SELE- Gene Selectin E

SELP- Gene Selectin P

SOD2 - Gene Superoxide Dismutase 2

STAT1- Gene Signal Transducer And Activator Of Transcription 1

STAT3- Gene Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
STAT5B- Gene Signal Transducer And Activator Of Transcription 5B
TBK1- Gene TANK Binding Kinase 1
TICAM1- Gene Toll Like Receptor Adaptor Molecule 1
TLR1- Gene Toll Like Receptor 1
TLR2- Gene Toll Like Receptor 2
TLR3- Gene Toll Like Receptor 3
TLR4- Gene Toll Like Receptor 4
TLR6- Gene Toll Like Receptor 6
TLR9- Gene Toll Like Receptor 9
TNF- Gene Tumor Necrosis Factor
TNFAIP3- Gene TNF Alpha Induced Protein 3
TNFRSF10A - Gene TNF Receptor Superfamily Member 10a
TNFRSF10B - Gene TNF Receptor Superfamily Member 10b
TNFRSF1A- Gene TNF Receptor Superfamily Member 1A
TNFRSF1B- Gene TNF Receptor Superfamily Member 1B
TNFSF10- Gene TNF Superfamily Member 10
TNFSF14- Gene TNF Superfamily Member 14
TP53- Gene Tumor Protein P53
TRADD- Gene TNFRSF1A Associated Via Death Domain
TRAF2- Gene TNF Receptor Associated Factor 2
TRAF3- Gene TNF Receptor Associated Factor 3
TRAF6- Gene TNF Receptor Associated Factor 6
TREM1- Gene Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 1
VCAM1- Gene Vascular Cell Adhesion Molecule 1
XIAP- Gene X-Linked Inhibitor Of Apoptosis

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : ESTUDO DE BIOMARCADORES PROTEICOS E PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DO NF- κ B NA SEPSE NEONATAL TARDIA: VALOR POTENCIAL NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO.....

PESQUISADOR: Dra. Patricia Palmeira.....

CARGO/FUNÇÃO: Pesquisadora Científica. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº. 18195/01-D

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Investigação Médica (LIM-36) localizado no Instituto da Criança do HC/FMUSP.

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 anos.....

DADOS DA PESQUISA

TÍTULO DA PESQUISA - ESTUDO DE BIOMARCADORES PROTEICOS E PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DO NF- κ B NA SEPSE NEONATAL TARDIA: VALOR POTENCIAL NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO.

PESQUISADOR PRINCIPAL Dra. Patricia Palmeira. Cargo/função: Pesquisadora científica do LIM-36 localizado no Instituto da Criança do HC/FMUSP.

DEPARTAMENTO/INSTITUTO - Departamento de Pediatria-Instituto da Criança do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Rubrica do Pai/ Responsável: _____

Rubrica do pesquisador: _____

CONVITE AOS PAIS OU RESPONSÁVEIS LEGAIS DO RECÉM-NASCIDO:

Convidamos seu filho (a) para participar desta pesquisa que vai ser realizada para tentar fazer o diagnóstico de infecção nos bebês mais rapidamente do que é feito atualmente. Os bebês, diferente das crianças maiores, não apresentam sinais claros de que estão com alguma infecção e, muitas vezes, quando eles têm febre ou não aceitam mais a alimentação, coisas comuns em bebês infectados, os pais o levam ao médico, mas o bebê já se encontra bem grave, sendo esta uma das causas de iniciar tardiamente o tratamento, quando o bebê não consegue se recuperar mais, por isso a mortalidade por infecção é elevada em todo o mundo.

Quando o bebê é internado para investigar se tem infecção ou não, é necessário realizar exames de sangue e entre estes citamos as culturas para identificar o microrganismo, a proteína C reativa para verificar se existe uma inflamação no bebê, porém estes exames nem sempre estão alterados e é por este motivo que os pesquisadores no mundo ao longo dos anos vêm desenvolvendo novas técnicas para identificar ou afastar a infecção com mais rapidez e precisão e, desta forma, os bebês também podem ser tratados com mais segurança ou podem ter alta se a infecção não for confirmada e o exame clínico dele estiver normal.

O sangue será coletado de uma veia do braço do bebê e os exames laboratoriais serão realizados no laboratório de investigação médica do Instituto da Criança (LIM-36).

A coleta do sangue causa um pouco de dor e o local pode ficar roxinho, porém logo estará normal novamente.

Não haverá nenhum risco para seu bebê, pois desde o começo ele vai ser tratado com antibióticos e somente serão suspensos quando os exames e o seu bebê estiverem normais como citado acima.

Esta pesquisa não trará benefícios diretos para seu filho (a), no entanto no final da pesquisa, os resultados poderão auxiliar outros bebês que internem com suspeita de infecção.

A qualquer tempo vocês terão acesso às informações sobre a pesquisa e os resultados poderão ser informados quando a pesquisa finalizar.

A qualquer momento vocês também terão liberdade de retirar seu consentimento e seu filho (a) será retirado (a) da pesquisa sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. Os resultados dos exames somente serão dados a vocês, pais e/ou responsáveis legais.

Não haverá indenização por parte do hospital por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Rubrica do Pai/ Responsável: _____

Rubrica do pesquisador: _____

Os pesquisadores estarão à disposição para esclarecimento de eventuais dúvidas e estes são:

Dra. PATRICIA PALMEIRA, Prof. Dra. MARIA ESTHER JURFEST RIVERO CECCON, Dra. MARIA HELENA BAPTISTA NUNES DA SILVA, FERNANDA ANDRADE MACAFERRI DA FONSECA que podem ser encontradas no endereço: Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 647, CTIN2 – telefone 011 26618590 no Centro de Cuidados Intensivos ou no LIM-36 - 011 26618782.

Se vocês pais e/ou responsáveis legais tiverem alguma dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de ética em Pesquisa (CEP)- Rua Ovídio Pires de Campos 225-5to andar- telefone (11) 2661-6442, ramais 16, 17, 18, ou (11) 2661-7585. E-mail cappelq.adm@hc.fm.usp.br.

Fui suficientemente informado a respeito da pesquisa “Estudo de biomarcadores proteicos e perfil de expressão gênica da via do NF-κB na sepse neonatal tardia: valor potencial no diagnóstico e prognóstico”.

Eu discuti as informações acima com a pesquisadora responsável: Dra. Patricia Palmeira ou as pessoas por ele delegadas (Dra. Maria Esther Jurfest Rivero Ceccon, Dra. Maria Helena Baptista Nunes da Silva, Fernanda Andrade Macafferri da Fonseca) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente que meu filho (a) participe deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura da mãe ou do pai ou responsáveis legais do recém-nascido

Data ____/_____/_____

Assinatura dos responsáveis pelo estudo

Data ____/_____/_____

Rubrica do Pai/ Responsável: _____

Rubrica do pesquisador: _____

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO) DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:..... Nº APTO:.....

BAIRRO: CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:..... Nº APTO:.....

BAIRRO: CIDADE:.....

CEP: TELEFONE: DDD(.....).....

Rubrica do Pai/ Responsável: _____

Rubrica do pesquisador: _____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

INSTITUIÇÃO COPARTICIPANTE – UGA II – HOSPITAL IPIRANGA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : ESTUDO DE BIOMARCADORES PROTEICOS E PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DO NF-κB NA SEPSE NEONATAL TARDIA: VALOR POTENCIAL NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO.....

PESQUISADOR: Dra. Patricia Palmeira.....

CARGO/FUNÇÃO: Pesquisadora Científica. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº. 18195/01-D

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Investigação Médica (LIM-36) localizado no Instituto da Criança do HC/FMUSP.

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 anos.....

DADOS DA PESQUISA

TÍTULO DA PESQUISA - ESTUDO DE BIOMARCADORES PROTEICOS E PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DO NF-κB NA SEPSE NEONATAL TARDIA: VALOR POTENCIAL NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO.

PESQUISADOR PRINCIPAL Dra. Patricia Palmeira. Cargo/função: Pesquisadora científica do LIM-36 localizado no Instituto da Criança do HC/FMUSP.

DEPARTAMENTO/INSTITUTO - Departamento de Pediatria-Instituto da Criança do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Rubrica do Pai/ Responsável: _____

Rubrica do pesquisador: _____

CONVITE AOS PAIS OU RESPONSÁVEIS LEGAIS DO RECÉM-NASCIDO:

Convidamos seu filho (a) para participar desta pesquisa que vai ser realizada para tentar fazer o diagnóstico de infecção nos bebês mais rapidamente do que é feito atualmente. Os bebês, diferente das crianças maiores, não apresentam sinais claros de que estão com alguma infecção e, muitas vezes, quando eles têm febre ou não aceitam mais a alimentação, coisas comuns em bebês infectados, os pais o levam ao médico, mas o bebê já se encontra bem grave, sendo esta uma das causas de iniciar tardiamente o tratamento, quando o bebê não consegue se recuperar mais, por isso a mortalidade por infecção é elevada em todo o mundo.

Quando o bebê é internado para investigar se tem infecção ou não, é necessário realizar exames de sangue e entre estes citamos as culturas para identificar o microrganismo, a proteína C reativa para verificar se existe uma inflamação no bebê, porém estes exames nem sempre estão alterados e é por este motivo que os pesquisadores no mundo ao longo dos anos vêm desenvolvendo novas técnicas para identificar ou afastar a infecção com mais rapidez e precisão e, desta forma, os bebês também podem ser tratados com mais segurança ou podem ter alta se a infecção não for confirmada e o exame clínico dele estiver normal.

O sangue será coletado de uma veia do braço do bebê e os exames laboratoriais serão realizados no laboratório de investigação médica do Instituto da Criança (LIM-36).

A coleta do sangue causa um pouco de dor e o local pode ficar roxinho, porém logo estará normal novamente.

Não haverá nenhum risco para seu bebê, pois desde o começo ele vai ser tratado com antibióticos e somente serão suspensos quando os exames e o seu bebê estiverem normais como citado acima.

Esta pesquisa não trará benefícios diretos para seu filho (a), no entanto no final da pesquisa, os resultados poderão auxiliar outros bebês que internem com suspeita de infecção.

A qualquer tempo vocês terão acesso às informações sobre a pesquisa e os resultados poderão ser informados quando a pesquisa finalizar.

A qualquer momento vocês também terão liberdade de retirar seu consentimento e seu filho (a) será retirado (a) da pesquisa sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. Os resultados dos exames somente serão dados a vocês, pais e/ou responsáveis legais.

Rubrica do Pai/ Responsável: _____

Rubrica do pesquisador: _____

Não haverá indenização por parte do hospital por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Os pesquisadores estarão à disposição para esclarecimento de eventuais dúvidas e estes são:

Dra. PATRICIA PALMEIRA ou FERNANDA ANDRADE MACAFERRI DA FONSECA que podem ser encontradas no endereço: Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 647, LIM-36 – (11) 26618782 e Dra. MARIA HELENA BAPTISTA NUNES DA SILVA, que pode ser encontrada no berçário do Hospital Ipiranga, no 7º andar, somente às quintas-feiras, telefone (11) 2067-7864.

Se vocês pais e/ou responsáveis legais tiverem alguma dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) no horário comercial (das 9:00 às 15:00) - Av. Nazaré, 28 – 9º andar - telefone (11) 2067-7708, (11) 2067-7936. E-mail: cep.hipiranga@gmail.com

Fui suficientemente informado a respeito da pesquisa “Estudo de biomarcadores proteicos e perfil de expressão gênica da via do NF-κB na sepse neonatal tardia: valor potencial no diagnóstico e prognóstico”.

Eu discuti as informações acima com a pesquisadora responsável: Dra. Patricia Palmeira ou as pessoas por ele delegadas (Dra. Maria Esther Jurfest Rivero Ceccon, Dra. Maria Helena Baptista Nunes da Silva, Fernanda Andrade Macaferri da Fonseca) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente que meu filho (a) participe deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura da mãe ou do pai ou responsáveis legais do recém-nascido

Data ____/____/____

Assinatura dos responsáveis pelo estudo

Data ____/____/____

Rubrica do Pai/ Responsável: _____

Rubrica do pesquisador: _____

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO) DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:..... Nº APTO:.....

BAIRRO: CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....

2.RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO:..... Nº APTO:.....

BAIRRO: CIDADE:.....

CEP: TELEFONE: DDD(.....).....

Rubrica do Pai/ Responsável: _____

Rubrica do pesquisador: _____



HOSPITAL GERAL - UTI Neonatal
Laboratório de Investigação Médica (LIM-36)
localizado no Instituto da Criança do HC/FMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TÍTULO DA PESQUISA: “ESTUDO DE BIOMARCADORES PROTEICOS E PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DO NF-κB NA SEPSE NEONATAL TARDIA: VALOR POTENCIAL NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO”

Pesquisador Responsável: Dra. Maria Isabel Valdomir Nadaf

Coordenadora: Patricia Palmeira - Cargo/função: Pesquisadora científica do LIM-36 localizado no Instituto da Criança do HC/FMUSP. Departamento de Pediatria-Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Equipe: Olga Akiko Takano; Mariela da Gama Fortunato Molina; Izabel Nazira Nadaf; Cleiton Ribeiro Lélis.

CONVITE AOS PAIS OU RESPONSÁVEIS LEGAIS DO RECÉM-NASCIDO:

Convidamos seu filho/sua filha para participar desta pesquisa que busca novos exames para o diagnóstico de infecção nos bebês mais rapidamente do que é feito atualmente.

Quando o bebê é internado na UTI para investigar se tem infecção ou não, é necessário realizar exames de sangue e culturas para identificar a causa, porém esses exames nem sempre estão alterados e é por este motivo que os pesquisadores no mundo vêm procurando novos exames para identificar ou afastar a infecção com mais rapidez e precisão.

Os exames laboratoriais desta pesquisa serão realizados em São Paulo no laboratório de investigação médica do Instituto da Criança (LIM-36) da Universidade de São Paulo (USP).

A qualquer tempo vocês terão acesso às informações sobre a pesquisa e os resultados poderão ser informados quando a pesquisa finalizar.

A qualquer momento vocês também terão liberdade de retirar seu consentimento e seu filho (a) será retirado (a) da pesquisa sem que isto traga prejuízo à continuidade do tratamento. Os resultados dos exames somente serão dados a vocês, pais e/ou responsáveis legais.

Não haverá indenização por parte do hospital por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Riscos: serão mínimos, relacionados com a imaturidade do recém-nascido que apresentam infecção no período de internação em UTI neonatal. A coleta do sangue causa um pouco de dor e o local pode ficar roxinho, porém logo estará normal novamente, e será coletado 3 mL a mais junto com os exames de rotina da UTI.

Benefícios: Os benefícios serão indiretos para o seu filho/ a sua filha por entender o que ocorre quando apresenta infecção no sangue. Os exames da pesquisa serão proteínas que aumentam durante a infecção, chamado de “biomarcadores proteicos” no sangue e os genes responsáveis por esses “biomarcadores” chamados de “perfil de expressão gênica da via do NF-κB”, que poderão ajudar no diagnóstico mais cedo da infecção no sangue.

Esta pesquisa não trará benefícios diretos para seu filho/sua filha, no entanto no final da pesquisa, os resultados poderão auxiliar outros bebês que internem com suspeita de infecção.

A pesquisadora responsável Maria Isabel V. Nadaf, estará à disposição para esclarecimento de eventuais dúvidas no celular (65) 98423-0254, gugubibi@gmail.com.

Se vocês, pais e/ou responsáveis legais tiverem alguma dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de ética em Pesquisa da Universidade de Cuiabá – UNIC, (65)3363-1271, cep.unic@kroton.com.br, Avenida Beira Rio, 3100, Jardim Europa. Bloco de Saúde II, térreo - Coordenação Mestrado. Cuiabá-MT, CEP: 78.065-900.



HOSPITAL GERAL - UTI Neonatal
Laboratório de Investigação Médica (LIM-36)
localizado no Instituto da Criança do HC/FMUSP

Fui suficientemente informado a respeito da pesquisa “Estudo de biomarcadores proteicos e perfil de expressão gênica da via do NF- κ B na sepse neonatal tardia: valor potencial no diagnóstico e prognóstico”. Eu discuti as informações acima com a pesquisadora responsável: Dra. Maria Isabel ou as pessoas por ela delegadas (equipe listada acima) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente que meu filho/minha filha participe deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura da mãe ou do pai ou responsáveis legais do recém-nascido

Data ____/____/____

Assinatura dos responsáveis pelo estudo

Data ____/____/____

Dados de identificação (ou etiqueta institucional de identificação) do participante da pesquisa ou responsável legal

1. Nome do recém-nascido:
SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
2. Mãe ou Responsável Legal
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE N°:.....
SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO:..... N° APTO:.....
BAIRRO:
CIDADE:..... CEP:
TELEFONE: DDD (.....)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DE BIOMARCADORES PROTEICOS E PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DO NF-kB NA SEPSE NEONATAL TARDIA: VALOR POTENCIAL NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO

Pesquisador: Patricia Palmeira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 53495516.6.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.486.313

Apresentação do Projeto:

A incidência de sepse neonatal é alta e o prognóstico é grave. A maior parte das complicações a curto e longo prazos associam-se aos efeitos dos fatores inflamatórios (como citocinas e fatores de crescimento, e os seus mediadores secundários, incluindo o óxido nítrico, tromboxanos, leucotrienos, fator de ativação de plaquetas, prostaglandinas e complemento) não contrabalançados adequadamente por citocinas anti-inflamatórias (como TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-10, TGF- β 2).

Experimentalmente, diferentes moléculas têm sido propostas como marcadores de gravidade e/ou prognóstico para sepse, incluindo proteínas de fase aguda, fatores de coagulação, marcadores celulares da membrana, receptores solúveis e citocinas. No entanto, ainda são poucos os marcadores aplicados com sucesso em estudos clínicos, tais como a PCR e a procalcitonina. Os dados até o momento, no entanto, são ainda insuficientes para incluir outros fatores nos painéis de rastreio atualmente usados para o diagnóstico e orientação de tratamento da infecção neonatal. Assim sendo, a disponibilização de um painel de biomarcadores poderia causar impacto significativo na morbimortalidade da sepse neonatal, contribuindo para a redução dos custos hospitalares devido ao uso desnecessário de antibióticos, reduzir o tempo de internação e, ainda,

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 1.486.313

diferenciar um bom ou mau prognóstico.

Objetivo da Pesquisa:

O presente estudo pretende descrever a expressão proteica e gênica de biomarcadores selecionados em recém-nascidos de termo com sepse tardia clínica e / ou comprovada, causada por bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, no dia do diagnóstico, na fase intermediária e na fase de convalescência. Está prevista a avaliação de 108 neonatos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa se enquadra em risco mínimo, não sendo realizados procedimentos outros, além daqueles relacionados ao cuidado médico. Não há benefícios diretos aos participantes da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo trata questões de grande interesse na clínica neonatal, está bem elaborado, conta os recursos financeiros e os pesquisadores tem toda a condição para levar o estudo a bom termo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O termo de consentimento livre e esclarecido está adequadamente redigido, é de fácil compreensão pelos responsáveis do neonato e apresenta todos os termos de garantia necessários.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O protocolo apresenta todas as condições de ser aprovada pela CAPPesq.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 1.486.313

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_658184.pdf	23/02/2016 10:00:20		Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinada.pdf	22/02/2016 14:01:36	Patricia Palmeira	Aceito
Outros	Cappesq_cadastro_online_assinado.pdf	01/02/2016 14:55:40	Patricia Palmeira	Aceito
Outros	Exequibilidade_assinada.pdf	01/02/2016 14:54:53	Patricia Palmeira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_assinado.pdf	01/02/2016 14:54:01	Patricia Palmeira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Marcadores_final_Comite.docx	01/02/2016 14:53:44	Patricia Palmeira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 11 de Abril de 2016

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DE BIOMARCADORES PROTEICOS E PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DO NF-kB NA SEPSE NEONATAL TARDIA: VALOR POTENCIAL NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO

Pesquisador: Patricia Palmeira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 53495516.6.3001.0065

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.970.557

Apresentação do Projeto:

Apresentação de projeto que já estava na plataforma brasil desde fevereiro 2016.

Projeto inclui pacientes HC_ICR.

Não foi possível visualizar parecer CAPPESQ.

Instituição proponente: Hospital das Clínicas da FMUSP

Instituição coparticipante: Faculdade de Medicina da USP

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do presente projeto é descrever a expressão proteica e gênica de biomarcadores selecionados em recém-nascidos (RN) de termo com sepse tardia clínica e / ou comprovadamente causada por bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, no dia do diagnóstico (dia 0), na fase intermediária (dia 3) e na fase de convalescência dia (7). Serão colhidas 108 amostras de sangue de RN divididas em grupos de acordo com o agente etiológico: RN com sepse comprovada causada por bactérias Gram-positivas (Grupo 1, n = 27); causada por bactérias Gram-negativas (Grupo 2, n = 27); causada por fungos (Grupo 3, n = 27) e; RN com sepse tardia clínica (Grupo 4, n

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

Continuação do Parecer: 1.970.557

= 27). Serão realizadas dosagens dos biomarcadores solúveis sTREM, IL-27, MBL, CX3CL1, Hepcidina, Endocan e IL-18, pelo método de ELISA e análise da expressão de CD64 na superfície de neutrófilos e monócitos por citometria de fluxo. Para a expressão gênica, será realizado o sequenciamento de nova geração dos genes relacionados com a via de sinalização do fator nuclear Kappa B (NF-B), utilizando o Kit TruSeq Targeted RNA Expression NF-B panel (Illumina Inc.). A análise estatística será feita pelo programa GraphPad Prism 5.0 e, além da análise estatística descritiva, serão realizados testes paramétricos ou não paramétricos de acordo com a distribuição dos dados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Apresentado TCLE a ser aplicado aos pais dos recém-nascidos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto adicionado à plataforma brasil em fev 2016. Não foi possível rever parecer CAPESQ, pois não aparece na plataforma brasil. Projeto incluirá pacientes HC- Instituto da Criança. Não está claro se trata-se de inclusão de instituição coparticipante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentado TCLE a ser aplicado aos pais dos recém-nascidos.

Recomendações:

O motivo da emenda deve estar claramente colocado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_846124 E2.pdf	14/03/2017 10:34:19		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_846124 E2.pdf	19/12/2016 14:28:38		Aceito
Outros	Carta_inclusao_lona.pdf	03/05/2016 10:31:07	Patricia Palmeira	Aceito

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 1.970.557

Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinada.pdf	22/02/2016 14:01:36	Patricia Palmeira	Aceito
Outros	Cappesq_cadastro_online_assinado.pdf	01/02/2016 14:55:40	Patricia Palmeira	Aceito
Outros	Exequibilidade_assinada.pdf	01/02/2016 14:54:53	Patricia Palmeira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_assinado.pdf	01/02/2016 14:54:01	Patricia Palmeira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Marcadores_final_Comite.docx	01/02/2016 14:53:44	Patricia Palmeira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 21 de Março de 2017

Assinado por:

**Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador)**

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ESTUDO DE BIOMARCADORES PROTEICOS E PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DO NF-KB NA SEPSE NEONATAL TARDIA: VALOR POTENCIAL NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO

Pesquisador: Patricia Palmeira

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 53495516.6.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.779.182

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda com a finalidade de adicionar o UGA II - Hospital Ipiranga como centro coparticipante do Projeto de Pesquisa "Estudo de biomarcadores proteicos e perfil de expressão gênica da via do NF-B na sepse neonatal tardia: valor potencial no diagnóstico e prognóstico", para a realização das coletas dos recém-nascidos com sepse.

Objetivo da Pesquisa:

Solicitar aprovação a inclusão da UGA II - Hospital Ipiranga como centro coparticipante do estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há mudança de nível do risco.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Será adicionada o UGA II - Hospital Ipiranga como centro coparticipante do Projeto de Pesquisa para a realização das coletas dos recém-nascidos com sepse. Não haverá aumento de custos e existem condições para a coleta e acondicionamento do material até seu transporte para LIM-36 no Instituto da Criança - HC/FMUSP. Há aprovação do Hospital Ipiranga, UGA-II para a realização da coleta.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi feita a adequação do TCLE com a inclusão do novo centro.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 2.779.182

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A solicitação pode ser aceita, pois não há prejuízo da proposta inicial.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_103808_0_E4.pdf	12/07/2018 12:13:17		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_103808_0_E4.pdf	12/07/2018 12:09:03		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Aprovacao_lpiranga.pdf	06/07/2018 11:39:49	Patricia Palmeira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEHospitalpiranga.pdf	15/03/2018 14:36:55	Patricia Palmeira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaInclusaolpiranga.pdf	15/03/2018 14:31:36	Patricia Palmeira	Aceito
Outros	Carta_Inclusao_Aline.pdf	16/10/2017 11:11:21	Patricia Palmeira	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinada.pdf	22/02/2016 14:01:36	Patricia Palmeira	Aceito
Outros	Cappesq_cadastro_online_assinado.pdf	01/02/2016 14:55:40	Patricia Palmeira	Aceito
Outros	Exequibilidade_assinada.pdf	01/02/2016 14:54:53	Patricia Palmeira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Marcadores_final_Comite.docx	01/02/2016 14:53:44	Patricia Palmeira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.779.182

SAO PAULO, 20 de Julho de 2018

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ESTUDO DE BIOMARCADORES PROTEICOS E PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DO NF-KB NA SEPSE NEONATAL TARDIA: VALOR POTENCIAL NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO

Pesquisador: Patricia Palmeira

Área Temática:

Versão: 7

CAAE: 53495516.6.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.937.543

Apresentação do Projeto:

Trata-se de apresentação de documentação e solicitação de inclusão de outro centro participante no Brasil.

Objetivo da Pesquisa:

No momento a pesquisadora responsável apresenta a seguinte documentação:

- 1) Pedido de inclusão do Hospital Geral e Maternidade de Cuiabá (MT).
- 2) Ofício de Concordância do Hospital Ipiranga

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há alteração de riscos e benefícios

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A inclusão do novo centro não traz prejuízo ao desenvolvimento ao protocolo inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não há alteração do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Recomendações:

não se aplica

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 2.937.543

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A CAPPesq examinou a documentação de anuência do Hospital Ipiranga e aprova a inclusão do Hospital Geral e Maternidade de Cuiabá.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1202931_E5.pdf	12/09/2018 16:50:31		Aceito
Outros	Carta_Inclusao_HG_MT.pdf	12/09/2018 16:46:40	Patricia Palmeira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Aprovacao_Ipiranga.pdf	06/07/2018 11:39:49	Patricia Palmeira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEHospitalIpiranga.pdf	15/03/2018 14:36:55	Patricia Palmeira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaInclusaoIpiranga.pdf	15/03/2018 14:31:36	Patricia Palmeira	Aceito
Outros	Carta_Inclusao_Aline.pdf	16/10/2017 11:11:21	Patricia Palmeira	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinada.pdf	22/02/2016 14:01:36	Patricia Palmeira	Aceito
Outros	Cappesq_cadastro_online_assinado.pdf	01/02/2016 14:55:40	Patricia Palmeira	Aceito
Outros	Exequibilidade_assinada.pdf	01/02/2016 14:54:53	Patricia Palmeira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Marcadores_final_Comite.docx	01/02/2016 14:53:44	Patricia Palmeira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar**Bairro:** Cerqueira Cesar**CEP:** 05.403-010**UF:** SP**Município:** SAO PAULO**Telefone:** (11)2661-7585**Fax:** (11)2661-7585**E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.937.543

SAO PAULO, 08 de Outubro de 2018

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br