

**UNIVERSIDADE SANTO AMARO**

**Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em  
Odontologia: Mestrado Em Odontologia, Área de  
Concentração em Implantodontia**

**Leonardo Diniz Resende**

**BIOMARCADORES NA SALIVA DE PACIENTES EM SEPSE**

**São Paulo – SP**

**2023**

**Leonardo Diniz Resende**

**BIOMARCADORES NA SALIVA DE PACIENTES EM SEPSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof. Dra. Débora Pallos

**São Paulo – SP**

**2023**

R341b Resende, Leonardo Diniz.

Biomarcadores na saliva de pacientes em sepse / Leonardo Diniz Resende. — São Paulo, 2023.

38 p.: il., P&B.

Dissertação (Mestrado em Odontologia com Ênfase em Implantodontia) — Universidade Santo Amaro, 2023.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Me. Dr.<sup>a</sup> Débora Pallos.

1. Sepse. 2. Polimorfismo IL-6. 3. TTV. I. Pallos, Débora, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

**Leonardo Diniz Resende**

**BIOMARCADORES NA SALIVA DE PACIENTES EM SEPSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Pallos

São Paulo, 30 de outubro de 2023

**Banca Examinadora**

**Profa. Dra. Débora Pallos**

.....

**Prof. Dr. Gilson Fernandes Ruivo**

.....

**Prof. Dr. Paulo Henrique Braz- Silva**

.....

**Conceito Final**

---

**Dedico esse trabalho às pessoas que tornaram tudo possível na minha vida profissional: Sandra e Marcelo, meus pais. Dedico também a minha professora e orientadora professora Dra. Débora Pallos.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois é Ele é a força maior que nos guia em direção da luz. A oportunidade de chegar até aqui ao lado de tantas pessoas queridas me faz sentir iluminado. Gratidão a vida e a todos que estão ao meu lado. A minha consideração os eleva às estrelas. Eu nunca estive sozinho.

Agradeço aos meus pais Sandra e Marcelo por toda ajuda não só ao longo desse processo do mestrado, mas também ao longo de toda a vida. Sem eles nada disso seria possível.

Agradeço a Zeila, grande amiga, que cuida de mim há tanto tempo e torna minha travessia ao longo da vida mais tranquila e serena. Sem ela eu não sei o que seria, mas sei que não poderia ser melhor do que sou hoje.

Agradeço a minha professora orientadora Débora Pallos, a quem tenho amizade desde os tempos da graduação e a quem muito me ensinou e ensina. Eu me sinto agraciado por ter sido seu aluno, na graduação e no mestrado. Como aluno da graduação eu sempre disse que se o meu caminho fosse seguir em direção a pós-graduação, esse caminho tinha de ser ao lado dela. E hoje, concluindo esse processo e me preparando para a entrada no doutorado, o sentimento não poderia ser melhor e maior do que é. Portanto, muito obrigado a minha querida professora que pelo exemplo me mostra o quão bom alguém pode ser, não apenas como profissional, mas no quesito de humanidade.

Agradeço a professora Dra. Yeon Jung Kim, por todo auxílio e ensinamentos ao longo do desenvolvimento desse trabalho e durante o mestrado. É muito bom ser seu aluno!

Agradeço ao professor Dr. Paulo Henrique Braz da Silva pelo auxílio e contribuição para o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço também aos seus alunos Rodrigo e Alexandre, que contribuíram com o auxílio durante os processos laboratoriais da nossa pesquisa.

Agradeço a professora Dra. Fabiana Martins e Martins de Oliveira pelos ensinamentos durante o mestrado e por ter auxiliado no processo de qualificação desse trabalho. Muito obrigado pela sua contribuição com a minha vida profissional.

Agradeço ao professor Dr. Wilson Roberto Sendyk, por ter me recebido tão bem no programa de mestrado da UNISA. Eu me senti acolhido desde o primeiro dia. Obrigado ao professor não só por ter aberto as portas de sua casa, mas por ter me feito sentir muito bem-vindo.

Agradeço a todos os professores da equipe de pós-graduação *stricto sensu* da UNISA, que me fizeram sentir acolhidos ao longo de todo esse processo. Quantos bons momentos passamos durante os créditos, que com muita diversão, tornaram possível a ampliação dos meus conhecimentos e evolução profissional.

Agradeço aos meus amigos da turma do mestrado, que me acolheram em um momento difícil da vida e que ajudaram a melhorar e atravessar o mestrado de forma mais fácil e descontraída. Com cada um deles pude aprender algo que vou levar para a vida. Obrigado por cada momento!

Agradeço a Universidade Santo Amaro e ao Instituto de Medicina Tropical pelo fornecimento das instalações laboratoriais para o desenvolvimento desse trabalho. Sem os laboratórios e materiais seria impossível a realização desse trabalho.

Agradeço a Universidade Santo Amaro pela bolsa Unisa e à CAPES pela bolsa PROSUP.

## RESUMO

Sepse é uma disfunção orgânica ameaçadora a vida e caracterizada por uma resposta imunológica desregulada do hospedeiro frente a uma infecção. Diversos biomarcadores tem sido avaliados para múltiplas finalidades em pacientes em sepse, podendo ser utilizados para fins diagnósticos, tratamento e prognóstico. O Torquetenovírus (TTV) causa viremia persistente e é muito prevalente em diversas populações ao redor do mundo. Não é causador de doença e sua carga viral tem sido relacionada com a o grau imunocompetência do hospedeiro. A Interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pleiotrópica importante no sistema imune e altos níveis de IL-6 no sangue são relacionados com risco elevado de sepse. Logo, o objetivo desse trabalho foi determinar os polimorfismos de IL-6 e quantificar a carga viral do TTV na saliva de pacientes em sepse, visando estabelecer uma possível relação entre sepse e ambos biomarcadores. Para tanto, foram coletadas 115 amostras de saliva, sendo divididas em três grupos: grupo com sepse, grupo doente sem sepse e grupo saudável. A carga viral do TTV foi quantificada e os polimorfismos da IL-6 determinados através do RT-PCR. Uma vez que os dados foram obtidos e analisados, foi possível concluir que os pacientes do grupo sepse apresentaram maiores níveis de TTV, exibindo uma média de 5,62 cópias de TTV log por mL enquanto o grupo doente sem sepse apresentou 5,43 cópias de TTV log por mL e o grupo controle 5,94. Com relação a distribuição dos genes da IL-6, não foi possível observar diferença estatística entre os genótipos encontrados, entre polimorfismo da IL-6 e os desfechos clínicos e nem associação entre o polimorfismo da IL-6 e a quantificação do TTV. Logo, não foi possível determinar influência do polimorfismo da IL-6 nos desfechos clínicos e também não foi possível correlacionar o TTV com os polimorfismos da IL-6, que se mostraram variáveis independentes. Entretanto, o aumento dos níveis da carga viral do TTV pode estar relacionado com a condição de deterioramento do quadro clínico dos pacientes.

**Palavras-chave:** Polimorfismo da IL-6; TTV; Sepse

## ABSTRACT

Sepsis is a life-threatening organic dysfunction characterized by a dysregulated immune response of the host to an infection. Several biomarkers have been evaluated for multiple purposes in sepsis patients and can be used for diagnostic, treatment and prognostic purposes. Torquetenovirus (TTV) causes persistent viremia and is very prevalent in diverse populations around the world. It does not cause disease and its viral load has been related to the degree of host immunocompetence. Interleukin 6 (IL-6) is an important pleiotropic cytokine in the immune system and high levels of IL-6 in the blood are related to an increased risk of sepsis. Therefore, the objective of this work was to determine IL-6 polymorphisms and quantify the viral load of TTV in the saliva of patients with sepsis, aiming to establish a possible relationship between sepsis and both biomarkers. For this purpose, 115 saliva samples were collected and divided into three groups: group with sepsis, ill group without sepsis and healthy group. TTV viral load was quantified and IL-6 polymorphisms determined by RT-PCR. Once the data were obtained and analyzed, it was possible to conclude that patients in the sepsis group had higher TTV levels, exhibiting an average of 4,420,223 copies of TTV/mL while the patient group without sepsis had 2,106,683 copies of TTV /mL and the control group 980,929. Regarding the distribution of IL-6 genes, it was not possible to observe statistical differences between the IL-6 polymorphisms and clinical outcomes. There was no association between IL-6 polymorphism and TTV quantification. Therefore, it was not possible to determine the influence of the IL-6 polymorphism on clinical outcomes and it was also not possible to correlate TTV with IL-6 polymorphisms, which proved to be independent variables. However, the increase in TTV viral load levels may be related to the deteriorating condition of the patients' clinical status.

**Key-words:** IL-6 polymorfism; TTV; Sepsis

## Lista de Abreviaturas

EBV	Herpesvírus humano 4
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assays</i> (Ensaio Sorológico imunoenzimático)
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-17	Interleucina-17
IL-18	Interleucina-18
IL-6	Interleucina-6
PCR	Polimerase Chain Reaction – Reação em cadeia da polimerase
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de base única)
TBSA	<i>Total burned surface area</i> (Área Total de Queimadura)
TLR-2	Receptores Tipo Toll-2
TLR-4	Receptores Tipo Toll-4
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
TNF- $\beta$	Fator de Necrose Tumoral beta
TTV	Torquetenovirus
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	6
2. Revisão de Literatura.....	8
2.1. Sepses .....	8
2.2. Torquetenovírus.....	11
2.3. Polimorfismo da IL-6.....	13
3. Objetivo.....	18
4. Materiais e Métodos.....	19
4.1. Critérios de Inclusão .....	19
4.2. Critérios de Exclusão .....	19
4.3. Coleta de Saliva .....	20
4.4. Processamento das amostras para o polimorfismo da Interleucina-6 .....	20
4.5. Processamento das amostras para a quantificação da carga viral do TTV....	21
4.6. Análise Estatística.....	22
5. Resultados.....	23
6. Discussão .....	27
7. Conclusão.....	31
Referências.....	32
APÊNDICE A .....	36
APÊNDICE B .....	37

## 1. Introdução

Sepse é uma disfunção orgânica ameaçadora a vida, caracterizada por uma resposta imunológica desregulada do hospedeiro frente a uma infecção (1). Atualmente, é entendida como uma tempestade de citocinas, na qual alguns pacientes produzem ambas citocinas as pró e antiinflamatórias, ao passo, que outros tem predominância de citocinas antiinflamatórias ou estão sendo produzidas em baixa quantidade, configurando um quadro de desregulação do sistema imunológico (2).

Após o terceiro consenso internacional em 2016 para definição de seps e choque séptico, a seps e ficou definida como uma resposta multifacetada do hospedeiro frente a uma infecção que pode ser amplificada por múltiplos fatores internos, levando a disfunção orgânica dependente do quadro patológico, que pode evoluir para choque séptico e morte (3). Portanto, seps e pode ser definida como disfunção orgânica secundária, com risco de morte, em decorrência de uma resposta desregulada do hospedeiro contra uma infecção (4).

Biomarcadores como endocan, interleucina-10, peptídeo natriurético pró-atrial tem sido avaliado para diversas finalidades em pacientes com seps e, podendo ser utilizados para fins diagnósticos e terapêuticos, bem como para previsão de prognóstico. As informações obtidas com base nos biomarcadores podem ajudar na tomada de decisão clínica e melhorar o manejo do paciente, especialmente se diagnosticada precocemente. Além disso, tornam possível o monitoramento da efetividade do tratamento e podem determinar ajustes, quando necessário (5). Diversos biomarcadores tem sido propostos e estudados, dentre eles, a Interleucina-6 (IL-6) – considerando seus polimorfismos e o Torquetenovírus (TTV), que tem se mostrado como um potencial biomarcador para processos patológicos envolvendo alterações no sistema imunológico, incluindo seps e.

Os anelovírus, como os Torquetenovírus humano, são comuns no viroma humano, sendo encontrados em diversos fluidos, como sangue saliva e urina, mas geralmente controlados pelo sistema imunológico. O TTV é prevalente em mais de 90% dos adultos, não sendo causador de doenças. Entretanto, sua carga viral está ligada à imunocompetência do hospedeiro, podendo ser um biomarcador do estado imunológico (6–9). Em 2021, Mallet e colaboradores conseguiram constatar que a

quantificação da carga viral do TTV manifestou-se vinculada à regulação do componente linfóide do sistema imunológico, e que o TTV pode ser utilizado como indicador biológico em relação a deterioração do estado clínico de pacientes internados em UTI (9).

A interleucina-6 (IL-6) é um importante biomarcador da função imunológica, com papéis pró e anti-inflamatórios. Está envolvida em diversos processos patológicos. Níveis elevados de IL-6 no sangue aumentam o risco de sepse. Alguns estudos evidenciam relação do polimorfismo -174C/G do gene da IL-6 com aumento do risco para sepse (10,11).

A ideia da utilização da saliva como matriz de análise para métodos de diagnóstico existe desde 1975, proposta por Dawes, que sugeriu a viabilidade do método devido a facilidade de coleta e a quantidade de informações determinantes em seus constituintes. O método de coleta da saliva é simples e não invasivo, além de o armazenamento ser fácil e de baixo custo quando comparado com a coleta de sangue, por exemplo (12).

A saliva contém uma variedade muito grande de biomarcadores, podendo ser considerada como um excelente material diagnóstico com grande potencial para o sangue no monitoramento, prognóstico e tratamento muitas doenças sistêmicas. A alta gama de ingredientes da saliva pode refletir, em tempo real, níveis de biomarcadores, bem como composição do plasma (13).

O monitoramento sequencial da carga viral do TTV através de amostras de saliva pode ser uma maneira simples e não invasiva de avaliar a funcionalidade do sistema imunológico em pacientes em sepse, visto que a possibilidade da quantificação da IL-6 da carga viral do TTV na saliva já foi demonstrada na literatura (14–16).

A literatura carece de informações relacionando o TTV em sepse e o polimorfismo da IL-6 (principalmente na população brasileira). Além disso, nenhum outro trabalho tentou evidenciar se existe relação entre o TTV e o polimorfismo da IL-6 em pacientes com sepse.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1. Sepses

A sepsis é uma condição médica grave e potencialmente fatal que surge como uma resposta inflamatória descontrolada do organismo frente a uma infecção. Atualmente sepsis é entendida como disfunção orgânica causada por uma tempestade de citocinas. Entretanto, até o último consenso, publicado em 2016, sepsis era entendida como processo inflamatório caracterizado por dois ou mais itens do quadro de SIRS (Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica – quadro 1) associado a evidência clínica de infecção (17).

<b>Quadro de SIRS</b>
Febre-temperatura corporal > 38,3 °C ou hipotermia (temperatura corporal < 36°C);
Taquicardia – frequência cardíaca > 90 bpm;
Taquipnéia – frequência respiratória > 20 irpm ou PaCO <sub>2</sub> < 32 mmHg;
Leucocitose ou leucopenia – leucócitos > 12.000 cels/ mm <sup>3</sup> ou < 4.000 cels/mm <sup>3</sup>

**Quadro 1 – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica**

Pereira Júnior et al., em 1998, realizaram um estudo de revisão de literatura objetivando elucidar os principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos na sepsis. O grupo define que a SIRS é uma resposta inflamatória a condição clínica severa e que o paciente com sepsis é aquele com a SIRS de origem infecciosa e, sepsis grave, aquele com disfunção orgânica. O choque séptico definido como sepsis associada a hipotensão arterial, apesar da adequada hipoperfusão volêmica com a presença de anormalidades da perfusão, que podem estar associadas à acidose metabólica, oligúria ou alteração aguda do estado mental. Além disso, o estudo mostra as disfunções pela sepsis nos diversos sistemas orgânicos correlacionando-as com as manifestações clínicas, laboratoriais e aos dados de monitorização hemodinâmica invasiva. Ao mesmo tempo, fornece linhas gerais para diagnóstico, avaliação da gravidade, monitorização e implicações terapêuticas, bem como as tendências terapêuticas da época (18).

A sepse é a principal causa de morte em pacientes tratados em Unidade de Terapia Intensiva (19). Em 2006, Koury et al., visaram determinar as características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais, bem como a mortalidade de pacientes adultos em sepse no Hospital Terciário e Privado da Cidade do Recife – BA. O grupo concluiu que a sepse é um problema mais comum em idosos e em pacientes com comorbidades associadas, promove alteração na coagulação sanguínea e altas taxas de mortalidade.

Sales Júnior, et al., em 2006, conduziram uma pesquisa epidemiológica da Sepse em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. Foi realizado um estudo prospectivo em 65 hospitais de todas as regiões do Brasil. Os pacientes foram acompanhados até o 28º dia de internação ou alta da UTI. Evidenciou-se elevada taxa de mortalidade em pacientes correspondente à 16,7% em pacientes com sepse, 34,4% com sepse grave e 65,3% com choque séptico, sendo o tempo médio de internação de 15 dias (20).

Em 2008, Zanon et al. conduziram um estudo no qual o objetivo foi avaliar a etiologia, os fatores prognósticos e a mortalidade de pacientes em sepse internados nas Unidades de Terapia Intensiva de Passo Fundo – RS. Para tanto, avaliaram 560 pacientes com SIRS durante 28 dias ou até a alta/óbito. Concluíram por meio deste, que a sepse possui uma taxa extremamente alta de mortalidade correspondente à 31,1%: sendo 6,1% para SIRS não infecciosa, 10,1% para sepse, 22,6% para sepse grave e 64,8% para choque séptico (19).

Klouwenberg et al. em 2015, investigaram a probabilidade de infecção em pacientes com sepse presumida no momento da admissão na Unidade de Terapia Intensiva. Concluiu-se que muitos pacientes admitidos com suspeita de sepse correspondem pobremente com a presença de infecção. O resultado sugeriu que a verdadeira incidência de sepse pode ter sido sobrestimada em diversos estudos (21).

Até 2016, sepse, sepse severa e choque séptico eram definidos de acordo com o consenso do *American College of Chest Physicians-Society of Critical Care Medicine*. Segundo o consenso, a definição para sepse requeria infecção (suspeita ou confirmada), falência orgânica, pelo menos a presença de dois itens do quadro da SIRS (22), que de acordo com *American College of Chest Physicians*, consiste em uma resposta inespecífica do organismo a uma variedade de situações como infecções, queimaduras entre outras situações que geram processo inflamatório e se

manifesta por duas ou mais destas condições: temperatura corporal maior que 38,3°C ou menor que 36°C; frequência cardíaca maior que 90 batimentos por minuto; frequência respiratória maior que 20 inspirações por minuto ou PaCO<sub>2</sub> menor que 32mmHg; contagem de glóbulos brancos maior que 12000/mm<sup>3</sup>, menor que 4000/mm<sup>3</sup> (23).

Em 2016, Singer et al. se reuniram com o objetivo de avaliar e atualizar as definições para sepse e choque séptico. A força tarefa foi composta por 19 membros com “expertise” na biopatologia da sepse, triagens clínicas e epidemiologia. A convenção foi pela *Society of Critical Care Medicine* unida a *European Society of Intensive Care Medicine*. A principal mudança definida foi que a sepse deve ser entendida como disfunção orgânica causada pela resposta desregulada do hospedeiro à uma infecção, excluindo e simplificando o antigo modelo de nomenclatura que classificava a sepse de acordo com a evolução de SIRS para sepse, sepse grave e choque séptico. As definições e critérios clínicos atualizados oferecem maior consistência para estudos epidemiológicos e triagem clínicas, além de facilitar reconhecimento precoce, aumentando o tempo de tratamento desses pacientes com sepse ou risco de sepse (3).

Em 2017, Taniguchi et al. coordenaram um estudo cujo objetivo foi determinar se os critérios para definição de Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica podem prever a mortalidade hospitalar em um acompanhamento de pacientes brasileiros. Os autores extraíram informações, da base de dados de uma unidade de terapia intensiva para adultos, em um hospital terciário privado. Foram estudados 932 pacientes. Concluíram que os pacientes que eram positivos para Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica estavam em estado crítico mais grave do que os pacientes que eram negativos, e tiveram mortalidade mais elevada. O fato de ser “positivo” aumentou o risco de óbito de maneira independente em 82% (24).

Em 2020, Pierrakos et al. realizaram uma revisão de literatura com o objetivo de avaliar o progresso na pesquisa no que se diz respeito aos biomarcadores relacionados a sepse. Para tanto utilizaram como palavras-chave apenas “biomarcadores” e “sepse”. Não houve restrições com relação a idade, idioma e todos os estudos, sejam clínicos e experimentais, foram incluídos e tabelados de acordo com o tipo do estudo, população, tamanho da amostra teste e controle e objetivo do estudo com relação ao biomarcador estudado. Os autores concluíram que a partir de

um amplo critério de inclusão, é difícil ter uma forte conclusão sobre os biomarcadores e sepse, visto que cada estudo é voltado para apenas um biomarcador e como a sepse tem uma fisiopatologia muito complexa, é necessário que haja estudos combinando biomarcadores e não isolando-os. Dessa forma, os autores recomendam métodos mais rigorosos e padronizados para avaliar biomarcadores em sepse (5).

## 2.2. Torquetenovírus

Os Anelovírus são os principais constituintes do viroma humano e são detectáveis em diversos fluidos, como sangue, saliva, bile e urina. A viremia é baixa, crônica e bem controlada pelo sistema imunológico. Dentro da família *Anelloviridae*, há três gêneros presente no viroma humano: *Alphatorquevirus*, *Betatorquevirus* e *Gammatorquevirus* (6). Os Torquetenovírus humano (TTV) são vírus pequenos e não envelopados com fita única de DNA circular (7), pertencentes ao gênero *Alphatorquevirus* (25).

O TTV causa viremia persistente e é muito prevalente em diversas populações ao redor do mundo, sendo que mais de 90% dos adultos tem o DNA do TTV presente no organismo em qualquer idade (7). Apesar de sua alta prevalência, TTV não é agente causador de doenças em humanos.

Entretanto, a carga viral do TTV encontrada no sangue está intimamente relacionada com a imunocompetência do hospedeiro. Altas cargas virais são encontradas em pacientes com infecção, pacientes que tomam medicamentos imunossupressores e/ou que estão em processo de rejeição à um transplante de órgãos (6,8). Logo, a carga viral aumentada de TTV no sangue pode ser considerado um biomarcador para o estado imunológico do paciente (9).

Akibari et al., em 2018, realizaram um estudo envolvendo 120 pacientes receptores de transplante renal. Através da obtenção de amostras sanguíneas, testaram a relação entre a quantificação do TTV e as complicações decorrentes do transplante renal. Os pesquisadores puderam concluir que um aumento na carga viral do TTV pode ser relacionado com complicações pós-transplante (26)

Um estudo prospectivo conduzido por Strassl et al., em 2018, tentou avaliar o TTV como um fator preditivo para doença infecciosa em pacientes que realizaram

transplante renal. A hipótese dos autores era de que um alto nível de TTV no sangue poderia refletir um nível excessivo de imunossupressão e assim precedendo infecções. Para testar a hipótese o TTV foi quantificado em 169 amostras de sangue periférico de pacientes em seis tempos, sendo um antes e cinco após o transplante renal. Os autores conseguiram concluir que há evidência do valor da quantificação do TTV para prever infecção secundária em pacientes transplantados e, mais do que isso, conseguiram estabelecer um nível-corte de TTV para adequação das drogas imunossupressoras (8).

Em 2021, um estudo de Mallet et. al. tentou relacionar a carga viral com as patologias instaladas e com o desfecho clínico de pacientes internados na UTI. Para tanto, o DNA viral do TTV e mais quatro herpesvírus foram analisados através de amostras de sangue de 377 pacientes. Os autores concluíram que a reativação dos herpesvírus depende da patologia que levou os pacientes a internação em UTI e foi associado com a extensão da alteração da resposta imunológica. A regulação da viremia do TTV apareceu especificamente associada com a modulação do compartimento linfóide do sistema imune e que o EBV e o TTV podem ser utilizados como biomarcadores para prever deterioração clínica em pacientes admitidos em UTIs (9).

Com a hipótese de que a carga viral do TTV poderia ser utilizada como um potencial biomarcador no prognóstico e acompanhamento da função do sistema imunológico em pacientes sob tratamento de melanoma com nivolumab ou pembrolizumab, Pescarmona et al. (2021) realizaram um estudo no qual avaliaram, através de uma abordagem retrospectiva quarenta e três pacientes com melanoma metastático. Os pacientes foram avaliados antes do início do tratamento e seis meses depois. O plasma sanguíneo foi coletado nesses dois tempos e após a quantificação do TTV no plasma, os pesquisadores puderam concluir que o tratamento de seis meses com os medicamentos analisados não teve impacto significativo na replicação do TTV e que carga viral do TTV em pacientes com melanoma não é um biomarcador confiável para predição da eficácia do tratamento (27).

Em 2022, Batista et al. conduziram um estudo cujo objetivo era correlacionar a carga viral do TTV com a função imunológica de pacientes que realizaram transplantes renais. Para tanto, os pesquisadores coletaram amostras pareadas de saliva e plasma sanguíneo antes e depois de pacientes submetidos ao transplante renal. Mesmo com

limitações do estudo (casuística pequena), os autores concluíram que o monitoramento da carga viral do TTV, através da saliva em combinação com plasma sanguíneo, pode permitir a avaliação do grau de imunocompetência em pacientes renais-transplantados (15).

Väisänen et al., em 2022, através de um estudo prospectivo, tentaram determinar o momento da infecção primária pelo TTV, bem como a carga viral e o tipo cepa envolvida, quantificando em amostras seriadas de soro sanguíneo coletadas de 102 indivíduos durante o período de infância, em um acompanhamento até os quinze anos de idade. Os resultados do estudo evidenciaram que a infecção primária do TTV acontece, principalmente, após o nascimento e aumenta durante os dois primeiros anos de idade, variando em carga viral e cepas, sendo que as cepas podem mudar rapidamente ou persistir por anos (7).

Em 2023, De Luca et. al. investigaram a carga viral do TTV, através de amostras do plasma sanguíneo e da saliva de pacientes com cirrose hepática. O objetivo do estudo foi investigar e comparar as cargas virais presentes em ambas as amostras e correlacionar características clínicas dos pacientes. Os pesquisadores concluíram que o TTV é encontrado em maior quantidade na saliva quando comparado com o plasma sanguíneo e que não foi possível determinar a correlação entre carga viral e o grau de imunossupressão em pacientes com cirrose hepática (14).

### **2.3. Polimorfismo da IL-6**

Um importante biomarcador relacionado com a imunocompetência do hospedeiro é a interleucina-6 (IL-6). A IL-6 é uma citocina com funções pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Induz resposta imune frente a situações como trauma, danos teciduais e moléculas microbianas específicas. Assim, é uma citocina relevante em muitas doenças como câncer, cardiopatias, doenças autoimunes e sepse (10). Altos níveis de IL-6 no sangue são relacionados com risco elevado de sepse e diversos polimorfismos foram identificados na região do gene promotor da citocina. Dentre esses o polimorfismo -174C/G do gene promotor, já evidenciado na literatura como contribuidor para o aumento do risco de sepse em algumas populações (11).

A *IL-6* é uma citocina multifuncional que regula respostas imunes e os seus efeitos se sobrepõem as da Interleucina-1 (*IL-1*) e fator de necrose tumoral (*TNF*) (28) e os seus polimorfismos são estudados em relação a diversas doenças que acometem o organismo. Por ser amplamente distribuída entre as células do periodonto e supostamente desempenhar papel elevado na resposta de células B observadas nos tecidos gengivais de pacientes com periodontite crônica, Trevilatto et al., desenvolveu um estudo em caucasianos brasileiros, no qual genótipo G/G foi estatisticamente associado à susceptibilidade crônica à periodontite ( $p=0,0038$ ) (28).

Carregaro, em 2010, conduziu uma pesquisa com o objetivo de investigar as possíveis associações entre 12 polimorfismos localizados nos genes *IL6*, *IL10*, *TLR-2*, *TLR-4*, *TNF- $\alpha$*  e *TNF- $\beta$*  em pacientes com sepse. A conclusão foi que sete de nove polimorfismos mostraram similares distribuições em frequências alélicas entre os pacientes e controles. Os dados sugerem que os polimorfismos *IL10* e *TLR-2* podem predispor os pacientes a Sepse (29).

Em 2011, Palumbo et al. tentaram determinar se existia associação entre polimorfismos das *IL-6*, *IL-10* e *IL-17* com o desenvolvimento da sepse. Para tanto, o grupo avaliou 71 pacientes com índice maior ou igual a 15% de queimadura TBSA (superfície total do corpo) e 109 indivíduos saudáveis. Os genótipos da *IL-6* (174C/G), *IL-10* (819C/T and 1082A/G) e *IL-17* (7488T/C) foram identificados aplicando os protocolos de reação em cadeia da polimerase e os níveis das citocinas no soro foram identificados com *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA). Os resultados obtidos não demonstraram associação dos polimorfismos com os pacientes em sepse. Somente o polimorfismo *IL-10* (-1088GG) apresentou uma associação com a quantidade de *IL-10* no soro, isso nos pacientes queimados e na sua evolução. Os autores sugeriram que este SNP (polimorfismo de único nucleotídeo) pode ser utilizado como um marcador de evolução dos casos de queimados (31).

Segundo Chaudhry et al. (2015), a *IL-6* é uma interleucina pleiotrópica com ambas as funções pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, sendo secretadas por células T macrófagos para estimular resposta inflamatória frente a diferentes situações, especialmente em relação a sepse. Os autores afirmam que a produção da *IL-6* é elevada em pacientes com sepse, indicando que a *IL-6* é associada com o desenvolvimento da sepse, além disso, ainda sugerem que a *IL-6* é uma citocina chave na fisiopatologia da sepse severa, podendo indicar maior risco de morte para

os pacientes que exibem níveis elevados no plasma. O objetivo dos autores foi realizar uma revisão de literatura determinar se citocinas específicas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias podem ser alvos com fins diagnósticos e terapêuticos para sepse. Para tanto, foram procurados, na base de dados MEDLINE, artigos com significância clínica de citocinas inflamatórias em sepse. Os autores encontraram que as citocinas pró-inflamatórias – *IL-6*, *IL-8*, *IL-18* e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a citocina anti-inflamatória – *IL-10* – aumentadas em pacientes com sepse. Em suma, uma diminuição na *IL-6* foi associada com uma melhora do prognóstico e a produção de *IL-10* foi encontrado como principal preditor da severidade e resultado fatal. Concluiu-se que ambas as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias constituem uma “espada de dois gumes” na doença. Em uma mão são proteínas críticas para eliminação da infecção enquanto por outro lado, produção excessiva pode causar danos em tecidos em órgãos. E um aumento nas citocinas *IL-10*, *IL-8* e TNF- $\alpha$  podem ter implicações no diagnóstico e tratamento da sepse (10).

Zidan et al., em 2013, objetivaram investigar a associação do polimorfismo do gene *IL-6* -174C/G com a susceptibilidade do desenvolvimento da pneumonia em crianças egípcias. O polimorfismo em questão foi genotipado em 210 crianças utilizando PCR-RFLP, enquanto os níveis de *IL-6* no soro foram medidos pelo método ELISA. O grupo concluiu que o polimorfismo do gene *IL-6* -174C/G pode contribuir para o desenvolvimento da pneumonia comunidade adquirida em crianças (32).

Em 2015, Panayides et al. avaliaram o impacto do polimorfismo da *IL-6* sobre a predisposição da sepse em pacientes com doença renal crônica. O grupo controle consistiu em 115 pacientes com doença renal crônica e sem infecção. O grupo teste consistiu em 198 pacientes com doença renal crônica associada a sepse. Os pesquisadores concluíram que o genótipo GG foi mais frequente no grupo teste do que no grupo controle. Todas as causas de mortalidade foram semelhantes até o 28º dia foi similar entre os pacientes com GG e GC/CC. Os níveis séricos de *IL-6* eram maiores em pacientes GC/CC e em disfunção múltipla dos órgãos. O genótipo GG predispõe a sepse em pacientes com doença renal crônica (33).

Em 2015, Feng et al. conduziram um estudo com o objetivo de investigar a associação de uma região promotora de polimorfismo na *IL-6* (-174G/C) rs1800795 e TNF- $\alpha$  (-308G/A) rs1800629 com a sepse induzida por pneumonia. A amostra total foi de 277 pacientes chineses com pneumonia severa induzindo sepse. O grupo concluiu

que os pacientes em cuidado intensivo com polimorfismos do alelo -308A TNF- $\alpha$  e o alelo 800795 C tiveram maior susceptibilidade ao choque séptico (34).

Lorente et al. elaboraram um trabalho cujo objetivo era determinar se há relação do polimorfismo da IL-6 (-174) com os níveis no soro e com a mortalidade de pacientes em sepse. Para tanto, coletaram amostras de soro dos pacientes para análise da presença dos polimorfismos bem como dos níveis de IL-6 encontrados. O grupo concluiu que dos 263 pacientes avaliados, 123 foram caracterizados como GC, 110 GG e 30 CC. Desses genótipos, os pacientes CC possuíam menores níveis de IL-6 e menor risco de morte, podendo ser o mais favorável (35).

Em 2017 Mao et al. realizaram uma pesquisa cujo objetivo era avaliar o risco de pneumonia induzindo sepse, examinando uma ligação entre a doença e o polimorfismo da IL-6 e IL-10. As amostras foram obtidas de 188 pacientes com sepse induzida por pneumonia, 162 pacientes com pneumonia e 200 de pacientes saudáveis para controle. O trabalho evidenciou que pacientes com o alelo IL-10 -1082AA e IL-6 -174 CC tiveram maior risco de sepse e aumentaram seus níveis de mRNA, indicando o polimorfismo como funcional, isto é, aumentando quantitativamente a produção de IL-6 e contribuindo para um risco aumentado de sepse induzida por pneumonia (36).

Jiménez-Souza et al, em 2017, desenvolveram uma pesquisa retrospectiva em 202 pacientes com sepse que passaram por grandes cirurgias cardíacas ou abdominais. O objetivo principal foi avaliação da morte dentro de 90 dias após o diagnóstico de choque séptico. A análise de sobrevivência mostrou que 55% dos pacientes morreram com sobrevivência média de 39 dias. Pacientes com genótipo CC tiveram uma taxa maior de mortalidade do que GG e CG. O genótipo CC evidenciou maior risco de morte por choque séptico durante os primeiros 7, 28 e 90 dias. Quando os pacientes foram estratificados pelo tipo de cirurgia, aqueles com o genótipo CC que passaram por cirurgia cardíaca tiveram maior risco de morte em 7 e 28 dias do que aqueles que passaram por cirurgia abdominal (1).

Em 2019, Hu et al. realizaram uma revisão de literatura cujo objetivo foi determinar se os polimorfismos da IL-6 poderiam estar relacionados com a sepse. Apesar de não haver associação significativa dos polimorfismos com aumento do risco de sepse na população geral, os autores puderam constatar, mesmo com as limitações do estudo – principalmente com relação ao tamanho da amostra – que o

polimorfismo -174C/G pode colaborar para um aumento do risco de sepse, especialmente nas populações asiáticas e africanas (11).

Galhardo et al., em 2020, conduziram um trabalho cujo objetivo foi investigar a saliva de pacientes hospitalizados com e sem sepse, identificando níveis de diferentes biomarcadores inflamatórios, sendo eles: proteína C-reativa, procalcitonina, interleucina-6 e óxido nítrico. Para tanto utilizaram amostras de saliva de pacientes em cuidado intensivo e diagnosticados com sepse. Os autores concluíram que pacientes com sepse tiveram níveis significativamente maiores de IL-6 quando comparados com o grupo controle (16).

Ferdosian et al. em 2021 desenvolveram um estudo com o objetivo revisar a literatura a sistematicamente sobre o polimorfismo da IL-6 -174 G>C relacionado a susceptibilidade a sepse infantil. Após a seleção dos artigos publicados (bases de dados: PubMed, ISI web of knowledge, Scopus, CINK, SID, SCIELO), os autores conseguiram analisar um total de 17 estudos com *n* de 1287 e controle de 2482 e foi possível concluir que não houve associação significativa encontrada para recém-nascido e pacientes pediátricos. Entretanto conseguiram associar o risco a subgrupos étnicos: caucasianos e africanos (37).

### **3. Objetivo**

O objetivo desse trabalho foi determinar os polimorfismos de IL-6 e quantificar a carga viral do TTV na saliva de pacientes em sepse, visando estabelecer uma possível relação entre sepse e ambos os biomarcadores.

## 4. Materiais e Métodos

Primeiramente o projeto foi encaminhado para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Taubaté (UNITAU) – número do Parecer: 1.859.012 (Apêndice A).

De cada participante foi colhida a história médica do prontuário. Os acompanhantes foram informados sobre o objetivo e a metodologia do estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B)

Todos os pacientes foram identificados por código, de tal forma que somente os pesquisadores tiveram acesso às informações. Esse estudo foi conduzido utilizando uma amostra de conveniência de 115 pacientes divididos em três grupos:

- Grupo com sepse: 54 pacientes com sepse
- Grupo doente: 34 pacientes doentes internados na UTI sem sepse.
- Grupo controle: 27 pacientes saudáveis

### 4.1. Critérios de Inclusão

- Grupo sepse**
  - Pacientes do Hospital Regional de Taubaté-SP com sepse, apresentando dois ou mais itens do quadro de (SIRS):
- Grupo doente sem sepse**
  - Pacientes hospitalizados no Hospital Regional de Taubaté-SP sem as características de sepse
- Grupo controle**
  - Pacientes saudáveis (ASA I e II) da clínica de odontologia da Universidade de Taubaté-SP

### 4.2. Critérios de Exclusão

- Pacientes que não concordaram em participar do estudo
- Pacientes sem condições de coleta de saliva

### 4.3. Coleta de Saliva

Amostras de saliva foram coletadas por meio de pipetas descartáveis e acondicionadas em tubos plásticos e devidamente identificados. Uma vez coletadas, as amostras foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

### 4.4. Processamento das amostras para o polimorfismo da Interleucina-6

O processamento das amostras para o polimorfismo da IL-6 foi realizado no *UNISA research center* (URC).

O DNA genômico foi extraído de acordo com as instruções do fabricante, por meio dos kits de extração de DNA da Quiagen - *QIAamp® Fast DNA Tissue Kit*.

Foram analisados os polimorfismos rs1800795 do gene da IL-6 na posição -174 por meio da técnica de RT - PCR.

Para a amplificação das amostras de DNA genômico foi utilizado o par de *primers* -174 (Invitrogen Life Technologies):

50-TTGTC AAGACATGCCAAGTGCT-30 (forward)

50-GCCTCAGAGACATCTCCAGTCC-30 (reverse)

Para a genotipagem dos SNP's rs1800795 do gene IL-6 foram utilizados os ensaios de discriminação alélica QIAGEN® e a amplificação e leitura foi realizada com o emprego da técnica de PCR em Tempo Real (Applied Biosystems). As amplificações foram conduzidas no Step One™ – Applied Biosystems. A reação foi composta de 20µl de máster mix (Genotyping Mastermix – Thermo-fisher), 2 µl do primer-probe Mix e 18 µl de H<sub>2</sub>O +DNA (30 nanogramas), obtendo um volume final de 40 µl. Os produtos do PCR foram analisados usando o TaqMan SNP Genotyping Assay para a genotipagem do SNP IL6-174 (rs1800795). Três possíveis genótipos podem ser detectados na posição -174 no gene promotor IL-6 definidos como G/G, G/C ou C/C.

	Temp.	Tempo	Ciclo
Incubação	50° C	2 min	1
Ativação enzimática	95° C	20 seg	1
Desnaturação	95° C	1 seg	40 x
Anealeamento/extensão	60° C	20 seg	

#### 4.5. Processamento das amostras para a quantificação da carga viral do TTV

O processamento das amostras para o polimorfismo da IL-6 foi realizado no Unisa Research Center (URC) da Universidade Santo Amaro (UNISA).

Para amplificação do DNA, foi realizada uma reação PCR tempo real sistema TaqMan, método de quantificação absoluta (curva padrão sintética com quantidades conhecidas de oligonucleotídeos sintéticos para quantificação de TTV).

A sequência de primers e sonda utilizados foram:

Primers	Sequência 5' - 3'
TTV_fwd	GTGCCGIAGGTGAGTTTA
TTV_rev	AGCCCGGCCAGTCC
TTV probe	FAM – TCAAGGGGCAATTCGGGCT-mgb

Para a amplificação do DNA foi utilizado o aparelho QuantStudio 6, com a seguinte ciclagem: etapa inicial de ativação de 95°C por 2min, desnaturação a 95°C por 15 segundos e alongamento/extensão a 60°C por 60 segundos (45 ciclos).

Ciclagem Padrão		Temp.	Tempo	Ciclo
GoTaq®	Ativação da			
	Polimerase	95° C	2 min	
	Denaturação	95° C	15 seg	45 x
	Anealeamento/extensão	60° C	1 min	

Os dados resultantes foram analisados usando o software QuantStudio Design & Analysis, versão 1.4.1

#### **4.6. Análise Estatística**

Para o presente trabalho foi adotado um nível de significância global de 5%, isto é, valor de  $P < 0,05$ . A distribuição de normalidade dos dados foi detectada pelo teste de Shapiro Wilks, diferenciando os dados paramétricos dos não paramétricos.

Para o grupo TTV o teste utilizado foi o de Kruskal-Wallis (não paramétrico) e para TTVlog o teste de ANOVA (paramétrico). Para análise qualitativa entre os grupos foi utilizado o teste quiquadrado. Para a análise dos genótipos em relação ao TTV e TTVlog, foi utilizado o teste de Mann-Whitney (TTV) e ANOVA (TTVlog). Para a comparação dos genótipos e do TTV com os desfechos clínicos, foi utilizado o teste quiquadrado.

## 5. Resultados

Foram avaliados 115 pacientes divididos em três grupos, sendo 54 do grupo com sepse, 34 do grupo doente (internados em UTI sem sepse) e 27 do grupo controle (saudáveis). No grupo com sepse a idade variou de 18 a 98 anos com média de 62,1  $\pm$  19,9, no grupo doente de 19 a 94 com média de 64,6  $\pm$  16,5 e no grupo controle de 25 a 79 com média de 56,7  $\pm$  13,9 (não houve diferença significativa entre os grupos  $p=0,212$ ).

Primeiramente verificou-se a presença ou ausência do TTV. Foi detectado em 63% no grupo controle, enquanto no grupo doente sem sepse ficou em 91,2% e 94,4% no grupo com sepse ( $p$ -valor  $<0,001$ ) (tabela 1). Os pacientes que não demonstraram quantificação do TTV na saliva (negativo) foram excluídos das futuras análises, isto é, as análises foram realizadas sobre total dos positivos (amostra de 99).

Para o desfecho final obteve-se um índice de óbito de 9,1% do grupo doente sem sepse contra 46,7% no sepse (tabela 1), caracterizando diferença estatística para o grupo sepse ( $p$ -valor = 0,002).

Tabela 1: Comparação dos Grupos (Fatores Qualitativos – gênero, qPCR TTV e desfecho)

		controle		doente sem sepse		sepse		Total		P-valor
		N	%	N	%	N	%	N	%	
Gênero	Feminino	16	59,3%	16	47,1%	25	46,3%	57	49,6%	0,514
	Masculino	11	40,7%	18	52,9%	29	53,7%	58	50,4%	
qPCR TTV	Negativo	10	37,0%	3	8,8%	3	5,6%	16	13,9%	<b>&lt;0,001</b>
	Positivo	17	63,0%	31	91,2%	51	94,4%	99	86,1%	
Desfecho	Alta			20	90,9%	24	53,3%	44	65,7%	<b>0,002</b>
	Óbito			2	9,1%	21	46,7%	23	34,3%	

Na quantificação do TTV e TTVLog através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, foi possível determinar que não houve diferença estatística entre os grupos (tabela 2).

Tabela 2: Comparação dos Grupos para TTV, TTV Log

Grupos		Média	Mediana	Desvio Padrão	Q1	Q3	N	IC	P-valor
TTV cp/ml	controle	980.929	277.504	1.524.493	78.711	1.099.617	16	746.988	
	doente sem sepse	2.106.683	527.205	4.733.748	47.564	1.317.783	32	1.640.130	0,059
	sepse	4.420.223	675.766	7.591.001	252.798	4.328.929	51	2.083.349	
TTV log cp/ml	controle	5,62	5,57	1,29	4,97	6,20	17	0,61	
	doente sem sepse	5,43	5,72	1,08	4,67	6,12	32	0,37	0,084
	sepse	5,94	5,83	0,90	5,40	6,63	51	0,25	

Através da comparação de post-hoc (os grupos aos pares), o grupo de doentes sem sepse apresentou menor número de cópias por mL de TTV quando comparado ao grupo com sepse, apresentando diferença estatística para o grupo com sepse (p-valor = 0,049) (tabela 3).

Tabela 3: P-valores do post-hoc dos grupos

		controle	doente sem sepse
TTV cp/ml	doente sem sepse	0,913	
	sepse	0,060	0,049
TTV log cp/ml	doente sem sepse	0,807	
	sepse	0,511	0,075

Na análise dos polimorfismos 19 amostras não amplificaram: 8 do grupo sepse, 9 do grupo doente sem sepse e 2 do grupo controle. Sendo assim, as análises estatísticas foram realizadas com 96 pacientes. **A partir do teste Qui-Quadrado foi possível constatar que diferença estatística para o alelo G quando comparado com o alelo C, isto é o alelo G foi predominante nos grupos de pacientes doentes sem sepse e com sepse. (Tabela 4).**

Tabela 4: Comparação dos Grupos para Distribuição dos alelos e genótipo da IL-6

		controle		doente sem sepse		sepse		Total		P-valor
		N	%	N	%	N	%	N	%	
Alelos	C	26	52,0%	12	24,0%	33	35,9%	71	37,0%	0,014
	G	24	48,0%	38	76,0%	59	64,1%	121	63,0%	
Genótipo	CC	8	32,0%	2	8,0%	8	17,4%	18	18,8%	0,135
	GC	10	40,0%	8	32,0%	17	37,0%	35	36,5%	
	GG	7	28,0%	15	60,0%	21	45,7%	43	44,8%	

P-valor - Teste Qui-Quadrado

Com objetivo de avaliar se existe associação entre o polimorfismo IL- 6 com a quantificação da carga viral do TTV, foi realizada uma comparação entre os dados do TTV e TTVlog com os diferentes genótipos. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (tabela 5)

Tabela 5: Comparação dos genótipos com a quantificação do TTV nos grupos estudados

			Média	Mediana	Desvio Padrão	Q1	Q3	N	IC	P-valor
TTV cp/ml	controle	CC	1.492.713	375.539	2.456.482	179.469	924.194	5	2.153.162	0,698
		GC	836.749	756.894	952.326	93.404	941.946	6	834.735	
		GG	806.497	100.651	1.072.114	34.631	1.572.631	5	939.732	
	doente sem sepse	CC	461.207	461.207	449.480	302.292	620.123	2	622.936	0,099
		GC	2.441.617	1.601.029	2.131.190	1.013.235	4.150.592	8	1.476.812	
		GG	2.040.094	314.303	6.157.455	74.115	639.926	14	3.225.413	
	sepse	CC	7.192.420	358.312	11.840.769	168.531	12.221.649	7	8.771.603	0,547
		GC	6.673.466	2.612.707	8.983.905	270.399	11.424.174	17	4.270.599	
		GG	2.876.467	908.758	4.900.297	292.618	1.470.548	20	2.147.610	
	Todos	CC	147.655.827	375.539	555.684.400	165.617	3.387.545	15	281.209.939	0,121
		GC	4.572.187	1.372.116	7.210.944	271.058	5.135.995	31	2.580.356	
		GG	2.310.850	617.655	5.058.782	131.897	1.332.767	39	1.587.676	
TTV log cp/ml	controle	CC	5,74	5,57	0,66	5,25	5,97	5	0,58	0,675
		GC	5,46	5,88	0,92	4,97	5,97	5	0,80	
		GG	5,20	5,00	1,06	4,54	6,20	5	0,93	
	doente sem sepse	CC	5,52	5,52	0,52	5,34	5,71	2	0,72	0,097
		GC	6,07	6,20	0,79	5,99	6,62	8	0,54	
		GG	5,35	5,44	0,95	4,82	5,81	14	0,50	
	sepse	CC	5,91	5,55	1,05	5,22	6,56	7	0,78	0,555
		GC	6,20	6,42	0,95	5,43	7,06	17	0,45	
		GG	5,90	5,95	0,78	5,45	6,16	20	0,34	
	Todos	CC	6,03	5,57	1,21	5,22	6,37	15	0,61	0,122

GC	6,04	6,14	0,92	5,43	6,71	30	0,33
GG	5,61	5,79	0,91	5,12	6,12	39	0,28

Teste de Mann-Whitney (TTV) e ANOVA (em TTV Log).

A distribuição dos desfechos clínicos também foi comparada com os genótipos e com a quantificação da carga viral do TTV (qPCR TTV). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos, sendo variáveis independentes.

Tabela 6: Comparação dos genótipos com o desfecho final e presença ou ausência de TTV

			CC		GC		GG		Total		P-valor
	N	%	N	%	N	%	N	%			
Desfecho	doente sem	Alta	1	100,0%	4	80,0%	10	90,9%	15	88,2%	0,765
		Óbito	0	0,0%	1	20,0%	1	9,1%	2	11,8%	
	sepsis	Alta	2	40,0%	6	40,0%	11	61,1%	19	50,0%	0,430
		Óbito	3	60,0%	9	60,0%	7	38,9%	19	50,0%	
	Todos	Alta	3	50,0%	10	50,0%	21	72,4%	34	61,8%	0,232
		Óbito	3	50,0%	10	50,0%	8	27,6%	21	38,2%	
qPCR TTV	controle	Negativo	2	28,6%	5	50,0%	2	28,6%	9	37,5%	0,565
		Positivo	5	71,4%	5	50,0%	5	71,4%	15	62,5%	
	doente sem	Negativo	0	0,0%	0	0,0%	1	6,7%	1	4,0%	0,707
		Positivo	2	100,0%	8	100,0%	14	93,3%	24	96,0%	
	sepsis	Negativo	1	12,5%	0	0,0%	1	4,8%	2	4,3%	0,357
		Positivo	7	87,5%	17	100,0%	20	95,2%	44	95,7%	
Todos	Negativo	3	17,6%	5	14,3%	4	9,3%	12	12,6%	0,636	
	Positivo	14	82,4%	30	85,7%	39	90,7%	83	87,4%		

Teste Qui-Quadrado

## 6. Discussão

O trabalho foi desenvolvido para verificar uma possível relação entre sepse, o polimorfismo da IL-6 e a carga viral do TTV. O nosso estudo constatou um aumento da carga viral de TTV em pacientes em sepse quando comparado com pacientes doentes sem sepse e saudáveis (tabela 2). Em especial na comparação entre os grupos doente sem sepse e com sepse, em que o aumento foi estatisticamente significativo (tabela 3).

No presente estudo verificamos que houve um aumento do número de cópias de TTV/ml no grupo doente com sepse, que apresentou uma média de 4.420.223 cópias de TTV/mL em comparação com o grupo doente sem sepse (média de 2.106.683 cópias de TTV/mL) e com o grupo controle (média de 980.929 cópias de TTV/mL). O aumento desses valores para o grupo com sepse poderia demonstrar que a presença do vírus em maiores quantidades é um indicador de deterioramento do quadro clínico dos pacientes analisados, visto que a alta carga viral do TTV tem se mostrado como um potencial biomarcador de processos relacionado a quadros de comprometimento do sistema imunológico como sugerido por Honorato et al., Strassl et al. e Batista et al (8,15,38).

Um estudo de coorte conduzido por Batista et al. foi capaz de evidenciar uma relação de aumento da carga viral do TTV, tanto em amostras de sangue como em amostras de saliva, em pacientes pós-transplante renal. Strassl et al. também demonstraram aumento da carga viral através de um estudo prospectivo, e mais que isso, foram capazes de evidenciar que o aumento da carga viral do TTV em pacientes transplantados pode estar relacionado com infecção, podendo servir como um biomarcador preditor de infecção (8).

Um estudo relacionando a carga viral do TTV na saliva de pacientes sob tratamento antirretroviral para HIV concluiu que tanto os pacientes assintomáticos como nos pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), os níveis de TTV estavam diretamente relacionados com a carga viral do HIV na circulação sanguínea e, significativamente reduzidos conforme o aumento da concentração de linfócitos TCD4+. Logo, o resultado desse estudo permite sugerir que a análise da carga viral do TTV na saliva pode ser um biomarcador sensível para o *status* dos linfócitos TCD4+ (imunocompetência dos indivíduos), bem como para produção de HIV em pacientes sob tratamento antirretroviral (38).

Embora no presente estudo tenha se observado o aumento da carga viral do TTV no grupo com sepse em relação aos outros dois grupos, a diferença entre os valores não foi estatisticamente significativa entre os grupos analisados, provavelmente devido índice de variabilidade encontrado na quantificação da carga viral do TTV ou devido ao tamanho do número amostral.

Em um estudo piloto publicado por Mallet et al, os pesquisadores constataram que houve um aumento da carga viral do TTV em amostras de sangue de pacientes em choque séptico (39). No trabalho publicado pelo mesmo grupo, em 2021, contando com um maior número amostral, foi possível observar que além de o TTV estar presente em maior carga viral nos pacientes com sepse e choque séptico, a viremia de um dos herpesvírus associado ao TTV pode estar associado a menores taxas de mortalidade (9). Levando em conta os dados observados por Mallet et al., pode-se sugerir que para próximos os estudos, sejam selecionados um maior número amostral, bem como, a possibilidade de associar a quantificação dos diferentes herpesvírus com o TTV em pacientes em sepse.

Com relação a quantificação da carga viral do TTV na saliva, o estudo mostrou a possibilidade de monitorar os níveis do potencial biomarcador com eficácia, exibindo excelente relação custo-benefício pela facilidade de coleta da amostra. De Luca et al. também conseguiram monitorar os níveis de TTV através da saliva. Mais do que isso conseguiram observar que a quantidade de cópias/mL de TTV na saliva dos pacientes eram estatisticamente maiores do que nas amostras de sangue. Embora os autores não tenham conseguido determinar correlação entre a carga viral do TTV e o grau de imunossupressão da população estudada, foi possível observar a eficácia da saliva como método de monitoramento da carga viral de TTV (14).

A IL-6, citocina pleiotrópica secretada por células T e macrófagos, desempenha um papel importante no estímulo da reação inflamatória e, conseqüentemente, na sepse. É documentado na literatura que pacientes com sepse exibem altos níveis de IL-6 (10). Sendo assim, um dos objetivos desse trabalho foi o de determinar os polimorfismos das IL-6 em pacientes em sepse.

Frente as amostras analisadas para o polimorfismo da IL-6 (n = 96) não foi possível constatar diferença estatística entre os grupos, com relação aos genótipos. Isto, é não foi possível determinar se há predominância de algum dos genótipos analisados nos grupos estudados. Todavia, na análise frequência alélica, foi possível

observar a predominância do alelo G em pacientes do grupo doente sem sepse e doente com sepse, indicando que o polimorfismo contendo o alelo G pode estar associado com doença. Esse resultado corrobora com o de Weber et al. que obtiveram em seu estudo alta frequência do alelo G do polimorfismo rs1800795 (IL-6), sendo considerado alelo de risco para população estudada (42).

Até o presente momento, não há outros estudos relacionando o polimorfismo da IL-6 em com sepse no Brasil. Isso se dá provavelmente pela dificuldade em virtude da miscigenação e diversidade das populações no Brasil, o que evidencia a necessidade da realização de estudos similares na região.

Jiménez-Souza et. al., com um número amostral superior ao do nosso trabalho, não conseguiu estabelecer diferença estatística entre a distribuição dos alelos e genótipos. A população analisada por Lorente et. al. foi aproximadamente 2,7 vezes maior do que avaliado nesse estudo e mesmo com um número amostral maior, os pesquisadores não constataram diferença estatística entre os grupos de alelos e genótipos, tendo também um resultado similar ao encontrado no presente estudo.

Das 115 amostras analisadas para o polimorfismo da IL-6, 19 não amplificaram. A não-amplificação pode ser relacionada a qualidade das amostras do grupo com sepse e doente, pois a saliva em pacientes hospitalizados em estado grave é, frequentemente escassa. Outro motivo que pode ser relacionado a não-amplificação do DNA das amostras é a sensibilidade do teste.

Tentou-se estabelecer relação entre os desfechos clínicos e o polimorfismo da IL-6 e não foi possível estabelecer diferença estatística para nenhum dos polimorfismos analisados. Resultado esse que diferiu do estudo realizado por Jimenez-Souza et al., que avaliou o risco de morte em 7, 28 e 90 dias e evidenciou uma relação estatisticamente relevante do genótipo CC com maior chance de progressão para choque séptico e morte. O mesmo também não pode ser observado no estudo conduzido por Lorente et. al., que conduziram um estudo semelhante e concluíram que o genótipo CC estava relacionado com as menores taxas de mortalidade quando comparado aos outros genótipos. A variabilidade das conclusões dos diferentes estudos pode estar relacionada com as populações analisadas. Os estudos de Lorente et. al. e Jimenez-Souza et al. foram desenvolvidos na Espanha, entretanto em diferentes regiões. Isso evidencia mais uma vez a necessidade de mais

estudos na população brasileira, que é composta por diversas etnias miscigenadas entre si.

De forma inédita, esse estudo tentou relacionar os polimorfismos da IL-6 com a quantificação do TTV nos pacientes analisados e foi observada nenhuma diferença estatística, evidenciando que são variáveis totalmente independentes.

## **7. Conclusão**

Em suma, não foi possível determinar influência do polimorfismo da IL-6 nos desfechos clínicos e também não foi possível correlacionar o TTV com os polimorfismos da IL-6, que se mostraram variáveis independentes. Porém, o aumento dos níveis da carga viral do TTV pode estar relacionado com a condição de deterioramento do quadro clínico dos pacientes.

## Referências

1. Jiménez-Sousa MA, Medrano LM, Liu P, Fernández-Rodríguez A, Almansa R, Gomez-Sanchez E, et al. IL-6 rs1800795 polymorphism is associated with septic shock-related death in patients who underwent major surgery: a preliminary retrospective study. *Ann Intensive Care*. 2017; 7(1): 22.
2. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *The Lancet Infectious Diseases*. 2013; 13(3): 260–8.
3. 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.
4. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, et al. Executive Summary: Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for the Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Critical Care Medicine*. 2021; 49(11): 1974–82.
5. Pierrakos C, Velissaris D, Bisdorff M, Marshall JC, Vincent JL. Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. *Critical Care Medicine*. 2020; 24(1): 287.
6. Arze CA, Springer S, Dudas G, Patel S, Bhattacharyya A, Swaminathan H, et al. Global genome analysis reveals a vast and dynamic anellovirus landscape within the human virome. *Cell Host & Microbe*. 2021; 29(8): 1305-1315.e6.
7. Väisänen E, Kuisma I, Mäkinen M, Ilonen J, Veijola R, Toppari J, et al. Torque Teno Virus Primary Infection Kinetics in Early Childhood. *Viruses*. 2022; 14(6): 1277.
8. Strassl R, Schiemann M, Doberer K, Görzer I, Puchhammer-Stöckl E, Eskandary F, et al. Quantification of Torque Teno Virus Viremia as a Prospective Biomarker for Infectious Disease in Kidney Allograft Recipients. *The Journal of Infectious Diseases*. 2018;218(8): 1191–9.
9. Mallet F, Diouf L, Meunier B, Perret M, Reynier F, Leissner P, et al. Herpes DNAemia and TTV Viraemia in Intensive Care Unit Critically Ill Patients: A Single-Centre Prospective Longitudinal Study. *Front Immunol*. 2021;12: 698808.
10. Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, Ali MM, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis. 2015; Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, Ali MM, McGuire F, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo*. 2013; 27(6): 669-84.
12. Pereira D, Cunha AS, Lima A, Anjos D, BoerNP. O Uso De Saliva Para Diagnóstico De Doenças Orais E Sistêmicas. *Revista Odontológica de Araçatuba*. 2014;35(1): 55-59

13. Zalewska A, Waszkiewicz N, López-Pintor RM. The Use of Saliva in the Diagnosis of Oral and Systemic Diseases. *Disease Markers*. 2019:1–2.
14. Falabello De Luca AC, Marinho GB, Franco JB, Tenório JDR, Andrade NS, Batista AM, et al. Quantification of Torque Teno Virus (TTV) in plasma and saliva of individuals with liver cirrhosis: a cross sectional study. *Front Med*. 2023; 10: 1184353.
15. Batista AM, Caetano MW, Stincarelli MA, Mamana AC, Zerbinati RM, Sarmento DJS, et al. Quantification of torque teno virus (TTV) DNA in saliva and plasma samples in patients at short time before and after kidney transplantation. *Journal of Oral Microbiology*. 2022; 14(1): 2008140.
16. Galhardo LF, Ruivo GF, Oliveira LD, Parize G, Santos SSFD, Pallos D, et al. Inflammatory markers in saliva for diagnosis of sepsis of hospitalized patients. *Eur J Clin Invest*. 2020; 50(5).
17. Srzić I, Adam VN, Pejak DT. Sepsis definition: What's new in the Treatment Guidelines. *Acta Clinica Croatica*. 2022; 61(1): 67-72.
18. Pereira Júnior GA, Marson F, Abeid M, Ostini FM, Souza SHD, Basile-Filho A. Fisiopatologia da sepse e suas implicações terapêuticas. *Medicina (Ribeirão Preto) - Simpósio: Medicina Intensiva: I. Infecção e Choque*. 1998; 31(3): 349–62.
19. Zanon F, Caovilla JJ, Michel RS, Cabeda EV, Ceretta DF, Luckemeyer GD, et al. Sepse na unidade de terapia intensiva: etiologias, fatores prognósticos e mortalidade. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2008; 20(2): 128-134.
20. Koury JCDA, Lacerda HR, Barros Neto AJD. Características da população com sepse em unidade de terapia intensiva de hospital terciário e privado da cidade do Recife. *Rev bras ter intensiva*. 2006; 18(1): 52-58.
21. Klein Klouwenberg PMC, Cremer OL, Van Vught LA, Ong DSY, Frencken JF, Schultz MJ, et al. Likelihood of infection in patients with presumed sepsis at the time of intensive care unit admission: a cohort study. *Crit Care*. 2015;19(1):319.
22. Kaukonen KM, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria in Defining Severe Sepsis. *N Engl J Med*. 2015; 372(17): 1629–38.
23. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference: *Critical Care Medicine*. 2003; 31(4): 1250–6.
24. Taniguchi LU, Pires EMC, Vieira JM Jr, Azevedo LCP. Systemic inflammatory response syndrome criteria and the prediction of hospital mortality in critically ill patients: a retrospective cohort study. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2017; 29(3): 317-324.
25. Varsani A, Opriessnig T, Celer V, Maggi F, Okamoto H, Blomström AL, et al. Taxonomic update for mammalian anelloviruses (family Anelloviridae). *Arch Virol*. 2021; 166(10): 2943–53.

26. Akbari H, Piroozmand A, Dadgostar E, Nikoueinejad H, Chitsazian Z, Einollahi B, et al. Prevalence of Transfusion-transmitted Virus (TTV) Infection and its Association with Renal Post- transplantation Complications in Iran. *International Journal of Organ Transplantation Medicine*. 2018; 9(3):127-131
27. Pescarmona R, Mouton W, Walzer T, Dalle S, Eberhardt A, Brengel-Pesce K, et al. Evaluation of TTV replication as a biomarker of immune checkpoint inhibitors efficacy in melanoma patients. Sengupta S, organizador. *PLoS ONE*. 2021;16(8): e0255972.
28. Trevilatto PC, Scarel RM. Polymorphism at position À174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *Journal of Clinical Periodontology*. 2003; 30(1): 438-442
29. Carregaro F, Carta A, Cordeiro JA, Lobo SM, Silva EHTD, Leopoldino AM. Polymorphisms IL10-819 and TLR-2 are potentially associated with sepsis in Brazilian patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105(5): 649–56.
30. Shimada T, Oda S, Sadahiro T, Nakamura M, Hirayama Y, Watanabe E, et al. Outcome prediction in sepsis combined use of genetic polymorphisms – A study in Japanese population. *Cytokine*. 2011; 54(1): 79–84.
31. Accardo Palumbo A, Forte GI, Pileri D, Vaccarino L, Conte F, D’Amelio L, et al. Analysis of IL-6, IL-10 and IL-17 genetic polymorphisms as risk factors for sepsis development in burned patients. *Burns*. 2012; 38(2): 208–13.
32. Zidan HE, Elbehedy RM, Azab SF. IL6-174 G/C gene polymorphism and its relation to serum IL6 in Egyptian children with community-acquired pneumonia. *Cytokine*. 2014; 67(2): 60–4.
33. on behalf of the Hellenic Sepsis Study Group, Panayides A, Ioakeimidou A, Karamouzou V, Antonakos N, Koutelidakis I, et al. -572 G/C single nucleotide polymorphism of interleukin-6 and sepsis predisposition in chronic renal disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015; 34(12): 2439–46.
34. Feng B, Mao Z rong, Pang K, Zhang S lei, Li L. Association of tumor necrosis factor  $\alpha$  -308G/A and interleukin-6 -174G/C gene polymorphism with pneumonia-induced sepsis. *Journal of Critical Care*. 2015;30(5): 920–3.
35. Gupta DL, Nagar PK, Kamal VK, Bhoi S, Rao DN. Clinical relevance of single nucleotide polymorphisms within the 13 cytokine genes in North Indian trauma hemorrhagic shock patients. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2015; 23(1): 96.
36. Lorente L, Martín M, Pérez-Cejas A, Barrios Y, Solé-Violán J, Ferreres J, et al. Association between Interleukin-6 Promoter Polymorphism (-174 G/C), Serum Interleukin-6 Levels and Mortality in Severe Septic Patients. *IJMS*. 2016; 17(11): 1861.
37. Mao ZR, Zhang SL, Feng B. Association of IL-10 (-819T/C, -592A/C and -1082A/G) and IL-6 -174G/C gene polymorphism and the risk of pneumonia-induced sepsis. *Biomarkers*. 2017; 22(2): 106–12.

38. Ferdosian F, Jarahzadeh MH, Bahrami R, Nafei Z, Jafari M, Raee-Ezzabadi A, et al. Association of IL-6 -174G > C Polymorphism with Susceptibility to Childhood Sepsis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Fetal and Pediatric Pathology*. 2021;40(6):638–52.
39. Chiu C, Legrand M. Epidemiology of sepsis and septic shock. *Current Opinion in Anaesthesiology*. 2021; 34(2): 71–6.
40. Honorato L, Witkin SS, Mendes-Correa MC, Conde Toscano ALC, Linhares IM, De Paula AV, et al. The Torque Teno Virus Titer in Saliva Reflects the Level of Circulating CD4+ T Lymphocytes and HIV in Individuals Undergoing Antiretroviral Maintenance Therapy. *Front Med*. 2022; 8:809312.
41. MIPrea group, REALISM group, Mallet F, Perret M, Tran T, Meunier B, et al. Early herpes and TTV DNAemia in septic shock patients: a pilot study. *ICMx*. 2019; 7(1): 28.

## APÊNDICE A

### PARECER CONSUBSTÂNCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Identificação do polimorfismo da IL-8 de Pacientes em Sepses do Hospital Regional de Taubaté - SP

**Pesquisador:** Debora Pallos

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 82593916.0.0000.5501

**Instituição Proponente:** Universidade de Taubaté

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.859.012

##### **Apresentação do Projeto:**

Projeto de pesquisa bem elaborado e embasado

##### **Objetivo da Pesquisa:**

Claro e conciso

##### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Foram atendidos e contemplados

##### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa interessante de tema atual que poderá auxiliar outras pessoas que estão em situação semelhante, comprometidas por doenças diversas ou acamadas

##### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram todos atendidos

##### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não existem

##### **Considerações Finais a critério do CEP:**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Taubaté, em reunião de 09/12/2016, e no uso das competências definidas na Resolução CNS/MS 406/12, considerou o Projeto de Pesquisa:

**Endereço:** Rua Visconde do Rio Branco, 210  
**Bairro:** Centro **CEP:** 12.020-040  
**UF:** SP **Município:** TAUBATÉ  
**Telefone:** (12)3635-1233 **Fax:** (12)3635-1233 **E-mail:** cepunitau@unitau.br

**APÊNDICE B****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O Sr. (a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa “**Identificação do polimorfismo da IL-6 de Pacientes em Sepse do Hospital Regional de Taubaté – SP**”.

**Descrição:** Sepse é uma situação com risco de vida, que ocorre quando um agente infeccioso (bactérias, vírus ou fungo) entra na corrente sanguínea de uma pessoa. A infecção afeta todo o sistema imune o que então desencadeia uma reação em cadeia que podem provocar uma inflamação descontrolada no organismo. Esta resposta de todo o organismo à infecção produz mudanças de temperatura, da pressão arterial, frequência cardíaca, contagem de células brancas do sangue e respiração. A sepse requer cuidados médicos imediatos.

Esse estudo tem por objetivo analisar por meio da saliva um marcador inflamatório a IL-6 em pacientes em sepse.

Para esta pesquisa será coletado uma amostra de saliva do paciente.

Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para recusar-se a participar. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo.

**Risco:** Os riscos são mínimos visto que o procedimento é simples e não invasivo.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

**Sigilo:** estou ciente de que qualquer informação a meu respeito obtida na pesquisa será confidencial. Foi me explicado que minha identidade não será revelada em qualquer descrição ou publicação desta pesquisa.

Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida ao senhor.

Leonardo Diniz Resende

**(012) 991659925 “INCLUSIVE LIGAÇÕES À COBRAR”**

Eu, \_\_\_\_\_,

portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa “**Identificação do polimorfismo da IL-6 de Pacientes em Sepsis do Hospital Regional de Taubaté – SP**”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

Assinatura