

**UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ**  
**Luciana Freitas Galhardo**

**MARCADORES INFLAMATÓRIOS NO  
DIAGNÓSTICO DE SEPSE NA SALIVA DE  
PACIENTES HOSPITALIZADOS: um estudo  
transversal**

**Taubaté - SP**  
**2018**

**UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ**  
**Luciana Freitas Galhardo**

**MARCADORES INFLAMATÓRIOS NO  
DIAGNÓSTICO DE SEPSE NA SALIVA DE  
PACIENTES HOSPITALIZADOS: um estudo  
transversal**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Odontologia do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté.

Área de concentração: Biologia Odontológica  
Orientadora: Profa. Dra. Mariella Vieira Pereira Leão.

**Taubaté - SP**  
**2018**

**LUCIANA FREITAS GALHARDO**

Data: \_\_\_\_\_

Resultado: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Universidade de Taubaté

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.

Dr. \_\_\_\_\_ Universidade \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **Agradecimentos**

*Agradeço aos pacientes do Hospital Regional do Vale do Paraíba, pela participação no estudo.*

*Aos meus chefes Dr. Caio Lucio Soubhia Nunes e Dra. Ana Claudia Delage por terem permitido a execução deste estudo.*

*À minha orientadora Profa. Dra. Mariella Vieira Pereira Leão pela contribuição, incentivo, paciência e apoio. Por toda ajuda no desenvolvimento deste estudo.*

*Ao Prof. Dr. Gilson Fernandes Ruivo que sempre se disponibilizou em me ajudar e sempre o fez com muito carinho e atenção.*

*À Profa. Dra. Debora Pallos, por toda ajuda no desenvolvimento deste estudo.*

*À aluna de graduação Luiza Barros Marcondes, por toda sua ajuda na coleta de amostras.*

*À Universidade de Taubaté e aos coordenadores e professores do Programa de Mestrado e Doutorado em Odontologia pelo aprendizado transmitido.*

*Agradeço aos meus familiares que sempre me incentivaram.*

*Ao meu marido Adelio, que foi muito importante nesse período, que me ajudou, me acalmou e me tranquilizou quando necessário.*

*Agradeço à Juliana Guimarães dos Santos, do Laboratório de Imunologia, pelo auxílio nas análises laboratoriais.*

*Agradeço a todos que fizeram parte desse ciclo de aprendizagem e conhecimento.*

Galhardo LF, 2018. Marcadores inflamatórios no diagnóstico de sepse na saliva de pacientes hospitalizados: um estudo transversal. Dissertação [Mestrado em Odontologia]- Universidade de Taubaté, 2018.

## RESUMO

**Introdução:** Sepse é um conjunto de manifestações sistêmicas graves produzidas por uma infecção. Os marcadores sanguíneos imunológico/inflamatórios são úteis na detecção precoce das disfunções orgânicas, auxiliando no diagnóstico de sepse e do choque séptico. Embora a detecção de biomarcadores no soro e/ou sangue seja uma prática padrão, sua detecção em amostras não invasivas, como a saliva, é desejável e tem sido bastante investigada. **Objetivo:** Investigar a saliva de pacientes hospitalizados com sepse e sem sepse e identificar os níveis dos seguintes marcadores da resposta inflamatória: proteína C reativa (PCR), procalcitonina (PCT), interleucina 6 (IL-6) e óxido nítrico (ON). **Métodos:** Amostras de saliva foram coletadas de 26 pacientes com diagnóstico de sepse internados em UTI e 26 pacientes hospitalizados sem sepse pareados (controle). Os níveis de PCR foram determinados pela técnica de aglutinação; de procalcitonina e IL-6, pelo método de ELISA; e de óxido nítrico, pela reação de Griess. Os resultados obtidos foram comparados estatisticamente, considerando-se como menor nível de significância  $p=0,05$ . **Resultados:** Dos 26 pacientes com sepse 12 eram do sexo feminino (46%) e 14 do sexo masculino (54%), com média de idade de  $63,81 \pm 3,48$  anos. Os pacientes do grupo controle apresentavam a mesma distribuição em relação ao sexo, com média de  $65,04 \pm 4,07$  anos de idade, não diferindo estatisticamente do grupo com sepse ( $p=0,82$ ). Ambos os grupos apresentavam boa higiene oral, e as condições dentárias e bucais foram semelhantes. Quanto aos marcadores inflamatórios, embora o grupo com sepse tenha apresentado médias de concentrações salivares de PCR, procalcitonina, IL-6 e ON superiores, somente para IL-6 observou-se significância estatística ( $p=0,0001$ ). **Conclusões:** Conclui-se que pacientes com sepse apresentaram níveis de IL-6 significativamente superiores na saliva, sugerindo que esta amostra biológica e esta citocina possam ser úteis no diagnóstico deste quadro.

**Palavras-chave:** Sepse; Saliva; Unidade de Terapia Intensiva; Biomarcadores.

Galhardo LF, 2018. Inflammatory markers in the diagnosis of sepsis in saliva of hospitalized patients: a cross-sectional study. Dissertation [Master's in Dentistry]-University of Taubaté, 2018.

## ABSTRACT

**Introduction:** Sepsis is a severe systemic manifestation produced by an infection. Blood inflammatory/immunological markers are useful in the early detection of organ dysfunction, aiding in the diagnosis of sepsis and septic shock. Although detection of sera/blood biomarkers is a standard practice, detection in non-invasive samples, such as saliva, is desirable and has been extensively investigated. **Objective:** To investigate the saliva of hospitalized patients in sepsis and without sepsis and identify levels of the following inflammatory markers: C-reactive protein (CRP), procalcitonin (PCT), interleukin 6 (IL-6) and nitric oxide (NO). **Methods:** Saliva samples were collected from 26 ICU patients with a diagnosis of sepsis and 26 hospitalized patients without sepsis (control). PCR levels were determined by the agglutination technique; procalcitonin and IL-6 by the ELISA method; and nitric oxide, by the Griess reaction. The results obtained were compared statistically, considering as lower level of significance  $p = 0.05$ . **Results:** Of the 26 patients with sepsis 12 were female (46%) and 14 males (54%) with a mean age of  $63.81 \pm 3.48$  years. Patients in the control group had the same distribution with regard to sex, averaging  $65.04 \pm 4.07$  years of age, but was not different from the sepsis group ( $p = 0.82$ ). Both groups presented good oral hygiene, and dental and oral conditions were similar. With regard to inflammatory markers, although the sepsis group presented higher salivary concentrations of CRP, procalcitonin IL-6 and ON, only for IL-6 it was observed statistical significance ( $p = 0.0001$ ). **Conclusions:** It was concluded that patients with sepsis had significantly higher levels of IL-6 in saliva, suggesting that this biological sample and this cytokine could be useful in the diagnosis of this condition.

**Keywords:** Sepsis; Saliva; Intensive Care Unit; Biomarkers.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	07
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	09
2.1 Sepses	09
2.2 Biomarcadores Séricos	12
2.3 Biomarcadores Salivares	16
<b>3. PROPOSIÇÃO</b>	20
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	21
4.1 Cálculo da amostra	21
4.2 População estudada	22
4.3 Critérios de Inclusão	22
4.4 Critérios de Exclusão	23
4.5 Caracterização e diagnóstico da sepsis	23
4.6 Coleta de saliva	24
4.7 Análise da saliva	24
4.8 Análise Estatística	27
<b>5. RESULTADOS</b>	29
5.1 Perfil epidemiológico dos pacientes	29
5.2 Análise dos biomarcadores salivares	32
<b>6. DISCUSSÃO</b>	39
<b>7. CONCLUSÃO</b>	46
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	47
<b>APÊNDICES</b>	56
<b>CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO</b>	60
<b>CUSTOS E FOMENTO</b>	60
<b>EXECUTORES DO PROJETO</b>	60

## 1 INTRODUÇÃO

A sepse é um conjunto de manifestações sistêmicas graves produzidas por uma infecção. A infecção pode estar localizada em apenas um órgão, como por exemplo, o pulmão, mas provoca em todo o organismo uma resposta inflamatória, que pode vir a comprometer o funcionamento de vários dos órgãos do paciente (ILAS, 2017).

A sepse é uma condição comum em ambientes de assistência à saúde, e está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade com incidências que variam consideravelmente, podendo chegar a uma de cada duas ou três mortes hospitalares (Mariansdatter et al., 2017). De acordo com a Associação Médica Brasileira (2016), o Brasil tem uma das mais altas taxas de mortalidades por sepse do mundo e alguns estudos epidemiológicos mostram que os índices brasileiros são maiores do que os de países economicamente semelhantes, como a Argentina.

De acordo com dados recentes dos Estados Unidos e Alemanha, a sepse é a mais dispendiosa razão de hospitalização. Por isso, a investigação de novos diagnósticos e tratamentos da sepse tem sido uma prioridade na medicina intensiva. Definir sepse é uma tarefa difícil, uma vez que não é uma doença definitiva, e a gravidade pode variar de uma forma leve de acometimento de um órgão à falência de múltiplos órgãos, que necessita de terapias invasivas para salvar o paciente. Assim, a disfunção de órgãos deve ser reconhecida o mais cedo possível e medidas devem ser tomadas sem demora, a fim de estabilizar o paciente e evitar qualquer dano secundário (Molnár et al., 2016).

Os marcadores laboratoriais são úteis na detecção precoce das disfunções orgânicas, auxiliando no diagnóstico de sepse e do choque séptico. As análises

laboratoriais, como a dosagem de gases sanguíneos, creatinina e bilirrubina, ácido láctico, eletrólitos, glicose e marcadores da inflamação, como proteína C reativa (PCR), procalcitonina (PCT), óxido nítrico (NO), citocinas, entre outros, refletem as alterações bio-físico-químicas que ocorrem nos tecidos na vigência da sepse e/ou choque séptico (Zavariz et al., 2006).

Embora a detecção de biomarcadores no soro e/ou sangue seja uma prática padrão, sua detecção em amostras não invasivas é desejável e tem sido bastante investigada. Javaid et al. (2016) avaliaram a saliva como uma potencial ferramenta de diagnóstico, devido à sua facilidade de obtenção e não-invasiva acessibilidade, a sua abundância de biomarcadores, como material genético e proteínas. De acordo com Zhang et al. (2016), considerando a precisão, a eficácia, a facilidade de coleta, uso, armazenamento e custo, testes salivares poderão estar disponíveis em consultórios odontológicos para diagnosticar doenças auto-imunes (síndrome de Sjögren, fibrose cística), doenças cardiovasculares, diabetes, vírus da imunodeficiência humana (HIV), câncer bucal, cárie, doenças periodontais, entre outras. Além disso, testes diagnósticos salivares poderiam permitir o rastreio de uma doença específica, numa população inteira, em tempo hábil (Javaid et al., 2016; Prasad et al., 2016).

De acordo com Mello et al. (2011) os níveis salivares de cortisol em pacientes com sepse grave pareciam ser melhores marcadores da atividade glicocorticoide, quando comparados aos níveis de cortisol sérico.

Uma vez que estudos sobre biomarcadores da inflamação na saliva de pacientes com sepse são raros, considerando as vantagens na obtenção e armazenamento destas amostras biológicas, pesquisas que os investiguem são necessárias e terão ampla aplicação na área médica e odontológica.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Sepses

A sepsis é uma síndrome que surge quando a resposta do organismo a uma infecção grave lesa seus próprios tecidos (Klouwenberg et al., 2015). Em 1992, um consenso internacional definiu, diferenciou e classificou a sepsis e condições relacionadas da seguinte forma:

– Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS): reação inflamatória a uma série de agressões, infecciosas ou não, adotando-se para a caracterização do envolvimento sistêmico a presença de, pelo menos, duas das seguintes alterações: Temperatura  $> 38^{\circ} \text{C}$  ou  $< 36^{\circ} \text{C}$ , Frequência cardíaca  $> 90$  batimentos/min, Frequência respiratória  $> 20$  movimentos/min ou  $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg ( $< 4,3$  kPa), Leucócitos  $> 12.000$  células/mm<sup>3</sup> ou  $< 4.000$  células/mm<sup>3</sup> ou  $> 10\%$  de formas jovens (bastonetes);

–SEPSIS: SIRS, acompanhada de foco infeccioso;

–SEPSIS GRAVE: sepsis com disfunção orgânica, sinais de hipoperfusão (acidose, oligúria, alteração aguda do estado mental, entre outros) ou hipotensão arterial (PA sistólica  $< 90$  mmHg ou redução de  $> 40$  mmHg da linha de base, na ausência de outras causas);

– CHOQUE SÉPTICO: sepsis grave com hipotensão, a despeito de adequada reposição volumétrica, associada à presença de anormalidades da perfusão;

– Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO): disfunção orgânica em que a homeostasia não pode ser mantida sem intervenção (Pugin et al., 2012).

Singer et al. (2016) discutem as definições de sepse e o choque séptico, e apontam que a sepse deve ser definida como uma disfunção orgânica com potencial fatal (superior a 10%) e o choque séptico deve ser visto como uma subdivisão da sepse, onde ocorrem anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas, as quais estão associadas a maior mortalidade (superior a 40%).

Em 2017, o Instituto Latino Americano reclassificou as condições relacionadas à sepse, estabelecendo os seguintes conceitos: síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), infecção, sepse e choque séptico. A SIRS permanece sendo reconhecida pelos mesmos sinais e sintomas. Paciente com INFECÇÃO é aquele que não apresenta disfunção, tendo ou não os critérios de SIRS, com foco infeccioso suspeito ou confirmado (bacteriano, viral, fúngico, etc.). Para sepse adotou-se a definição de presença de disfunção orgânica ameaçadora à vida em decorrência da presença de resposta desregulada à infecção. E choque séptico foi definido pela presença de hipotensão não responsiva à utilização de fluídos, independente dos valores de lactato (ILAS, 2017).

As taxas de mortalidade de sepse aumentaram durante a última década, representando um de cada três mortes em hospitais nos EUA. Entretanto, a estimativa da incidência de sepse ainda é difícil, pois depende do consenso na definição do quadro (que até 1992 não existia), do método utilizado para avaliar a condição da população subjacente (Mariansdatter et al., 2016).

A identificação precoce dos sinais e sintomas é de crucial importância para a instituição de medidas terapêuticas que se baseiam, fundamentalmente, em reposição volêmica, antibioticoterapia, emprego de corticosteróides, tratamento anticoagulante, medidas de manutenção da viabilidade biológica e suporte nutricional. Apesar da expressiva produção de conhecimento acerca da

fisiopatologia e do tratamento, a sepse permanece uma entidade de difícil manejo clínico (Batista et al., 2011).

Embora a suspeita clínica de infecção seja um fator de diagnóstico da sepse, pouco se sabe sobre a precisão desse diagnóstico no contexto de pacientes que apresentam, em UTI, sinais e sintomas de uma "síndrome de sepse". Klouwenberg et al., (2015) avaliaram a probabilidade de ocorrência real de infecção em pacientes que foram tratados para sepse na admissão à UTI, e associaram com a mortalidade. Os autores verificaram que de 2579 doentes tratados para sepse, somente 13% tinham uma probabilidade de infecção, geralmente associada com maior tempo de permanência e complicações. Os pacientes com uma infecção improvável tiveram uma taxa de mortalidade mais elevada em comparação com os pacientes com uma infecção definida.

A hipotermia está associada a desfecho adverso em pacientes com sepse. Wiewel et al. (2016) estudando 525 pacientes com sepse, verificaram que a hipotermia, identificada em 186 pacientes, foi significativamente associada à mortalidade. Fatores de risco para ocorrência da hipotermia incluíram baixo índice de massa corporal, hipertensão e insuficiência cardiovascular crônica. Além disso, os marcadores de ativação endotelial estavam aumentados nestes pacientes, sugerindo que a disfunção vascular desempenha um importante papel na sepse hipotérmica.

A fisiopatologia da sepse depende das relações estabelecidas entre o agente etiológico e o hospedeiro. Muitos dos aspectos a respeito do desencadeamento dessa condição mórbida permanecem em aberto, provavelmente pela falta de uma compreensão mais adequada dos aspectos bioquímicos da resposta imune e do processo inflamatório. As hipóteses propostas para explicar a gênese da sepse

devem incluir o conhecimento da interação patógeno/sistema imune inato, da inflamação/mediação imunológica adaptativa e do sistema de coagulação (Batista et al., 2011).

É importante dizer, também, que os índices de sepse em UTIs de países em desenvolvimento são alarmantes. Machado et al. (2017) associam a prevalência e a mortalidade de sepse no Brasil com fatores organizacionais, principalmente no que se refere a recursos financeiros disponíveis. Os autores concluem que os locais com menos recursos são os que possuem piores desfechos da sepse, bem como chamam a atenção para a necessidade de instrumentos que visem à prevenção, o diagnóstico precoce e o tratamento adequado de sepse no Brasil.

## **2.2 Biomarcadores Séricos**

Os biomarcadores podem ser utilizados como valiosas ferramentas na detecção, avaliação de risco, diagnóstico, prognóstico e monitoração de diversas condições patológicas, podendo apresentar-se de diversas formas, tais como: microrganismos, anticorpos, DNA, RNA, lipídeos, metabólitos ou proteínas (Morgado, 2015; Zhang et al., 2016).

Atualmente, proteínas de fase aguda, citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, marcadores de superfície celular e quimiocinas estão sendo usados para diagnosticar a sepse neonatal. Os marcadores mais comumente utilizados são fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), proteína C-reativa (PCR), proteína C reativa altamente sensível (hs -CRP) e pró-calcitonina (PCT) (Ganesan et al., 2016).

A proteína C reativa (PCR) é, provavelmente, o marcador mais frequentemente utilizado para determinar a presença e dimensionar a gravidade da reação inflamatória. É uma proteína de fase aguda produzida pelos hepatócitos após um estímulo de mediadores inflamatórios, como a IL-6 e a IL-8. As elevações das chamadas proteínas de fase aguda são importantes para o diagnóstico e monitoramento da evolução do processo infeccioso/inflamatório. Enquanto alguns autores encontram uma associação deste marcador com a severidade da sepse e choque séptico, outros questionam o valor da PCR elevada no seu diagnóstico e na estratificação de sua gravidade (Zavariz et al., 2006).

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória produzida pelos linfócitos T e B, que desempenha diversas funções nas respostas imunes celulares e humorais, sendo um biomarcador importante no diagnóstico do processo inflamatório (Volp et al., 2008). Segundo Mally et al. (2014) a IL-6 é mais sensível que a PCR, mas não pode ser usada como único marcador de sepse, pois tem meia-vida curta.

Segundo Ganesan et al. (2016) a IL-6 é um marcador altamente sensível e a PCR é um marcador mais específico para o diagnóstico de sepse neonatal. Desta forma, a combinação de IL-6 e PCR são os melhores preditores desta condição.

A Procalcitonina (PCT) tem demonstrado a mais alta confiabilidade no diagnóstico precoce de sepse, sepse grave ou choque séptico, em comparação com outros biomarcadores séricos ou dados clínicos sozinhos. A PCT é um precursor do hormônio calcitonina, secretado em pacientes saudáveis pelas células C da tireóide. Durante as infecções sistêmicas, a PCT é secretada por vários outros tecidos, resultando num aumento sérico considerável (Lanziotti et al., 2016). Além do

diagnóstico de sepse, PCT tem sido utilizada também para esclarecer a origem bacteriana de algumas infecções localizadas (Angeletti et al., 2015).

Tem sido observado que a dosagem de PCT na admissão hospitalar reduz a antibioticoterapia precoce em situações de baixo risco e diminui o tempo de uso dos antibióticos em casos de infecções severas (Sager et al., 2017).

Para Cabral et al. (2018), os biomarcadores são de suma importância para que sejam evitados cuidados médicos desnecessários, e a PCT é a líder para identificação de infecções, por ser considerada um método preciso e prático, melhorando os resultados dos pacientes.

De acordo com o estudo de Patel et al. (2015), os níveis de PCT fornecem resultados relevantes (informações clínicas) sobre o estado de saúde em pacientes portadores da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. Outros resultados apontam também que a PCT pode desempenhar um papel durante o diagnóstico da inflamação periodontal, e um nível elevado de PCT salivar pode ser um indicativo de outras doenças periodontais (Hendek et al., 2015).

A análise da cinética da procalcitonina e da proteína C reativa em pacientes recém-nascidos que passaram por cirurgia cardiotorácica indicou que a procalcitonina é um bom biomarcador da sepse, e a mesma possui melhor desempenho que a proteína C reativa nestes casos, sendo que valores acima de 5 mg/L entre as primeiras 48 horas indicam alto risco de sepse (Pérez et al., 2016).

Os níveis de procalcitonina podem ser utilizados, também, no diagnóstico de sepse grave em pacientes que sofreram queimaduras graves, assim como no monitoramento da terapia antimicrobiana, pois se trata de um método confiável e de fácil medição (Mokline et al., 2015).

Nos casos de pacientes sépticos, o acompanhamento dos níveis de procalcitonina pode ser utilizado para o conhecimento do prognóstico e para prever a mortalidade destes pacientes, conforme indica o estudo feito por Peschanski et al. (2016).

Em pacientes com transplante de medula, os biomarcadores de sepse podem ser utilizados no diagnóstico complementar para distinguir as infecções de outras causas de febre. Stoma et al. (2016) estudaram a presepsina, a procalcitonina e a proteína C-reativa, e verificaram que a presepsina obteve melhor desempenho para este fim.

No caso de pacientes com câncer, pode ser feito o uso da procalcitonina, mas é recomendável que sejam realizadas combinações com outros métodos, tais como CD64 e Interleucina 6 (IL-6), conforme reportado por Sbrana et al. (2016).

Outra molécula sinalizadora chave na inflamação, resposta imune e câncer é o óxido nítrico (ON), gerado pelo óxido nítrico sintetase (NOS) (Fukumura et al., 2006). Embora sendo uma das mais simples moléculas biológicas na natureza, o óxido nítrico está envolvido em muitos processos fisiológicos no homem, que incluem neurotransmissão, controle da pressão sanguínea, coagulação do sangue e participação na capacidade do sistema imunológico de destruir células tumorais e parasitas intracelulares. Assim, a estimulação de sua produção, bem como das citocinas pró-inflamatórias, beneficia a defesa e impede a instalação, multiplicação e permanência de patógenos nos tecidos (Jorjão, 2012).

Para Aranke et al. (2011), o óxido nítrico é um excelente biomarcador da inflamação, e após a validação e padronização do método para sua detecção, haverá um grande avanço na medicina molecular.

Sundar et al. (2013) avaliaram os níveis de óxido nítrico na periodontite crônica e agressiva generalizada, e concluíram que o óxido nítrico é um potente biomarcador de doenças inflamatórias e de condições patológicas. Os autores chamaram a atenção para a importância de combinação da análise do soro e da saliva na detecção das condições inflamatórias.

### **2.3 Biomarcadores Salivares**

A saliva é o líquido secretado pelas glândulas salivares, a qual umedece a cavidade bucal. A saliva possui funções importantes, tais como: proteção da mucosa e dos dentes, formação do bolo alimentar, digestão inicial de polissacarídeos, regulação do pH bucal e também tem sido um eficiente marcador no diagnóstico de diversas doenças (Bretas et al., 2008; Lima et al., 2014).

A saliva é um fluido corporal eficaz no diagnóstico de doenças orais e sistêmicas, tratando-se de um método adequado e confiável, o qual pode ser utilizado também no monitoramento de doenças (Helmerhost et al., 2018).

Diversas são as funções desempenhadas pela saliva, contendo inúmeras vantagens, quando comparada ao sangue, na sua utilização como fonte de biomarcadores. Seu processo de coleta é pouco invasivo, não doloroso e de fácil aplicação, além das amostras salivares poderem ser manuseadas e armazenadas com maior facilidade, já que não coagulam como o sangue. Por isso, a saliva tem sido reconhecida como uma fonte não invasiva e segura de marcadores biológicos, podendo ser um substituto do sangue no diagnóstico e prognóstico de doenças diversas (Morgado, 2015).

A saliva tem sido cada vez mais utilizada como um bio-amostra-biomarcador, constituindo-se um diagnóstico alternativo ao sangue, tendo em vista que o uso desta oferece resultados confiáveis com custos reduzidos (Patel et al., 2015).

Lima et al. (2014) propõem o uso da saliva para o diagnóstico de doenças orais e sistêmicas, pois se trata de um fluido corporal com elevada participação nas funções patológicas e fisiológicas do organismo humano.

Em uma revisão de literatura Javaid et al. (2016) analisaram a evolução do uso de biomarcadores salivares no diagnóstico das seguintes doenças: doenças autoimunes, doenças cardiovasculares, diabetes, HIV, câncer bucal, cárie e doenças periodontais; ressaltando a sua precisão, eficácia, facilidade de uso e custo. Os resultados foram satisfatórios em todos os aspectos analisados, mas os autores ressaltam a necessidade de padronização no método, assim como a necessidade de regulamentos que fortifiquem o uso deste no diagnóstico, principalmente em clínicas odontológicas.

Ding et al. (2016) realizaram uma meta-análise sobre o uso potencial de miniRNAs salivares como biomarcadores para diagnóstico do câncer. À partir de 17 estudos, os autores concluíram que a saliva poderia ser usada como fonte de detecção de miniRNAs, apresentando potencial para obtenção de biomarcadores para detecção do câncer.

A detecção de processos inflamatórios crônicos utilizando a saliva também tem sido estudada. Trabalhos sobre os principais biomarcadores da inflamação, como: fator de necrose tumoral, IL-1, IL-6, IL-8, quimiocinas, ciclooxigenase (COX), 5-lipoxigenase e proteína C-reativa, destaca que tanto os marcadores salivares, quanto os urinários têm demonstrado grande eficiência na identificação de

processos inflamatórios, e, no caso da análise da saliva, os autores ressaltam o fato de ser “não invasiva, precisa, rápida, fácil de usar e barata” (Prasad et al., 2016).

Em um estudo com pacientes diabéticos (Tipo 1 e 2-T1D e T2D), Dezayee & AlNimer (2016), analisaram a taxa de fluxo salivar e quantificaram PCR em amostras de saliva. Os resultados obtidos mostraram que a taxa de fluxo salivar era menor em T1D, quando comparada aos indivíduos saudáveis e com T2D, e que PCR era positiva (acima de 6 mg/ L) em 36% e 56% dos pacientes com T1D e T2D, respectivamente. Concluiu-se que a PCR em saliva poderia ser utilizada como biomarcador da síndrome metabólica, sendo seu valor mais evidente em T2D quando comparado à T1D.

A saliva também tem sido estudada para o diagnóstico de disfunção orgânica em pacientes com sepse ou choque séptico. Dezayee & AlNimer (2016), analisando o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), o cortisol salivar, o cortisol total, além de colesterol e lipoproteínas, concluíram que o cortisol salivar não foi relevante no diagnóstico de insuficiência adrenal em comparação ao cortisol total, entretanto os autores ressaltaram a necessidade de mais estudos sobre o tema para corroborar tais resultados. Já Elbuken et al. (2016), demonstraram a eficiência do uso de cortisol salivar (SAC) em vez de cortisol total sérico (STC) para o diagnóstico de insuficiência adrenal em pacientes com sepse grave.

Mello et al. (2011) também já havia destacado a utilidade de SAC. Os autores estudaram pacientes com sepse grave, pacientes em pós-operatório e pacientes saudáveis. Nos pacientes com sepse grave, a concentração média de cortisol salivar foi 2,6 vezes superior à dos pacientes pós-operatórios, que apresentaram níveis 5,4 vezes maiores que os pacientes saudáveis. O cortisol total sérico também foi maior

nos pacientes com sepse grave, quando comparado aos pacientes controle e pacientes em pós-operatório. Os autores concluíram que o cortisol salivar em pacientes críticos poderia ser um melhor indicador laboratorial do que o cortisol total no soro, pois refletiu de forma mais realista a gravidade dos pacientes. A principal limitação que os autores encontraram na análise do cortisol salivar foi em coletar as amostras em pacientes entubados e desidratados, problema que poderia ser superado coletando-se as amostras após a reposição volumétrica.

A utilização da saliva para verificação de insuficiência adrenal parece ser eficiente também em crianças de 1 a 12 anos, em choque séptico (Singh et al., 2013).

Embora a utilização da saliva para diagnóstico das disfunções orgânicas dos pacientes com sepse esteja bem caracterizado, o encontro de um biomarcador inflamatório precoce e específico poderia auxiliar na elaboração de medidas que possibilitariam reduzir o risco de desenvolvimento destas disfunções.

### **3 PROPOSIÇÃO**

Este estudo teve como objetivo analisar a saliva de pacientes hospitalizados com sepse e sem sepse, e identificar os níveis dos seguintes marcadores inflamatórios: proteína C reativa, procalcitonina, IL-6, óxido nítrico.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Taubaté (CAAE 89572717.0.0000.5501) e pelo Hospital Regional do Vale do Paraíba, em Taubaté/SP, conforme determina a resolução vigente sobre pesquisas com seres humanos (Resolução nº 510/2016- Conselho Nacional de Saúde).

Os acompanhantes dos pacientes foram informados sobre o objetivo e a metodologia do estudo e, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

### 4.1 Cálculo da amostra

Devido ao desconhecimento do tamanho da população em sepse, três parâmetros desconhecidos foram definidos, os quais:

- O nível de confiança desejado; o erro de amostragem permitido; a verdadeira proporção de “sucesso”,  $n = (z)^2 p (1 - p) / e^2$ . O nível de confiança usado na determinação do tamanho da amostra foi de 95% (caso em que o  $z=1,96$ ) porque proporciona bom equilíbrio entre a precisão e a confiabilidade. O erro da amostragem permitido foi de 20% ou seja,  $e=0,20$ , que é o volume do erro que estamos dispostos a aceitar ao estudar a proporção da população, ou seja, é a diferença máxima provável entre a proporção amostral e a verdadeira proporção populacional. Como a verdadeira proporção de sucessos é desconhecida, e não temos informação do passado e nem experiências relevantes, foi usado o  $p=0,5$  como o modo mais conservador de determinar o tamanho da amostra. Essa decisão resultou no maior tamanho da amostra possível.

Assim, quando  $p= 1/2 (0,5)$ ,  $n = (z)^2 / 4d^2$ .

$n= (1,96)^2/4 (0,20)^2$ .

$n=3,8416/0,16$ .

$n=24,1$ .

Considerando 5% de perdas ou recusas, o tamanho da amostra ficou estabelecido em 26 pacientes por grupo.

#### **4.2 População estudada**

Ao todo, foram selecionados para o estudo 52 pacientes, divididos em dois grupos distintos, os quais:

- Grupo sepse: 26 pacientes internados em UTI com diagnóstico de sepse;
- Grupo controle: 26 pacientes hospitalizados sem sepse, com as mesmas características de sexo e idade do grupo teste.

#### **4.3 Critérios de Inclusão**

Os pacientes foram incluídos neste estudo de acordo com os seguintes critérios:

- Pacientes hospitalizados;
- Pacientes em sepse, para o grupo “sepse”;
- Pacientes sem sepse, com condições de sexo e idade ao grupo sepse, para o grupo “controle”;
- Pacientes com consentimento ou com autorização e consentimento dos acompanhantes.

#### 4.4 Critérios de Exclusão

Os pacientes foram excluídos deste estudo de acordo com um critério básico, o qual:

- Pacientes sem condições de coleta de saliva.

#### 4.5 Caracterização e diagnóstico de sepse

A caracterização e o diagnóstico de sepse foram feitos a partir dos sintomas a seguir:

1. Febre-temperatura corporal  $> 38,3$  °C ou hipotermia temperatura corporal  $< 36$ °C
2. Taquicardia – frequência cardíaca  $> 90$  bpm;
3. Taquipnéia – frequência respiratória  $> 20$  irpm ou  $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg;
4. Leucocitose ou leucopenia – leucócitos  $> 12.000$  cels/  $\text{mm}^3$  ou  $< 4.000$  cels/ $\text{mm}^3$ , ou a presença de  $> 10\%$  de formas jovens (bastões) (ILAS, 2016).
5. Presença de disfunção orgânica

Todos os pacientes foram identificados por código, de tal forma que somente os pesquisadores tivessem acesso às informações.

De cada participante foi colhida a história médica do prontuário, e as seguintes informações: sexo, idade, tempo de internação, motivo de internação, local de infecção (quando presente) e etiologia, momento do desenvolvimento de sepse, tempo de sepse, uso de antibióticos, presença de ventilação mecânica, dados laboratoriais, óbito e condição bucal e dentária (Apêndice B - Ficha Clínica).

#### 4.6 Coleta de saliva

Amostras de saliva dos pacientes foram coletadas por meio de pipetas descartáveis e acondicionadas em tubos plásticos identificados. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento das análises. Para o grupo teste, a coleta de amostras ocorreu nas primeiras 24 horas após o diagnóstico de sepse.

#### 4.7 Análise da saliva

Foram realizadas as análises de PCR, PCT, IL-6 e de óxido nítrico. Os níveis de PCR foram determinados pela técnica de aglutinação, de IL-6 e PCT, utilizando-se método de ELISA, e de óxido nítrico, pela reação de Griess.

- *Dosagem da proteína C reativa (PCR) - Método de aglutinação*

A saliva em análise foi colocada em contato com um reagente que contém partículas de látex revestidas com anticorpo anti-PCR (Wama Diagnóstica, São Carlos-SP, Brasil). A PCR, se presente, provoca a aglutinação visível a olho nu das partículas do látex.

De cada amostra de saliva foram pipetados 25uL em lâmina de fundo preto e em seguida adicionados 25uL do reagente para PCR. Com auxílio de um bastão, foi realizada a homogeneização com movimentos circulares por um minuto e depois disso realizada a leitura da reação. Nas amostras que não ocorreram aglutinação a amostra foi considerada não reagente e a dosagem de PCR considerada inferior a 6,0 mg/l (sensibilidade do teste). Já nas amostras em que houve a aglutinação a amostra foi considerada reagente e então foram realizadas diluições seriadas da

mesma para obtenção do maior título positivo. Para estas amostras, a quantidade de PCR foi calculada multiplicando-se o título por 6,0 mg/l.

- *Dosagem de Procalcitonina*

Os níveis de Procalcitonina foram determinados pela técnica ELISA (Human PCT, ELISA Elabscience, Bethesda, USA).

Foram adicionados 100 ul da amostra de saliva ou do padrão de PCT com concentrações conhecidas (curva-padrão) em cada poço de uma placa de 96 orifícios sensibilizada com anticorpo anti-PCT. Em seguida incubou-se por 90 minutos a 37°C.

Após a primeira incubação, as amostras foram retiradas e foram adicionados a cada poço 100ul de anticorpo de detecção específico para PCT, conjugado à biotina. Em seguida, a placa foi novamente submetidas à incubação, desta vez, por 60 minutos a 37°C.

Terminada a incubação os líquidos foram aspirados e a placa foi lavada três vezes com tampão de lavagem. Após, foram adicionados 100 ul de estreptoavidina, marcada como peroxidase e nova incubação foi realizada.

Depois da terceira incubação, os poços foram lavados e aspirados 5 vezes com tampão de lavagem, então, foram adicionados 90 ul de reagente de substrato. Após nova incubação por 15 minutos a 37°C, foram adicionados aos orifícios 50 ul de solução de parada e a leitura das densidades óticas foi realizada.

Após obtenção das densidades óticas, os níveis de PCT presentes nas salivas foram determinados utilizando o programa GraphPadPrism 4.0.

- *Dosagem de IL-6*

Os níveis de IL-6 foram determinados pela técnica ELISA (Human IL-6 DuoSet ELISA R&D Systems, Minneapolis, USA).

Placas de microtitulação de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com anticorpos de captura específicos para IL-6 humana (100uL/poço).

As placas foram mantidas “*overnight*” em temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas passaram por 3 lavagens com tampão de lavagem (PBS com 0,05% de Tween 20) e foram bloqueadas com 300uL de tampão de bloqueio (PBS com 1% de soro albumina bovina, BSA) por 1 hora a temperatura ambiente. Após, foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e receberam 100 uL das amostras de saliva ou 100 uL dos padrões de IL-6 com concentrações conhecidas (curva-padrão).

Os testes foram realizados em duplicata e as placas mantidas 2 horas a temperatura ambiente. Após, as placas foram novamente lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e houve o acréscimo de 100 uL de anticorpos de detecção específico para cada biomarcador marcado com biotina. As placas foram mantidas por 2 horas em temperatura ambiente.

Após lavagem, foi acrescentada estreptoavidina (100 uL/poço) e as placas mantidas por 20 min cobertas com papel-alumínio para evitar luz direta. Após lavagem, a reação foi revelada com 100 uL/poço de solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio. As placas foram tampadas com papel-alumínio para evitar a luz direta e mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados em cada poço da placa 50 uL de solução *stop* (ácido sulfúrico 2 N). As densidades ópticas (DO) foram lidas no leitor de microplacas (Biotek) com comprimento de onda de 450 nm.

Após obtenção das densidades ópticas, os níveis de IL-6 presentes nas salivas foram determinados utilizando o programa GraphPadPrism 4.0.

- *Dosagem de óxido nítrico*

Os níveis de óxido nítrico salivares foram determinados indiretamente pela concentração de nitrito detectada pelo reagente de Griess, composto por volumes iguais de três soluções (A, B e C).

A solução A foi produzida a partir de 0,6 g de ácido sulfanílico dissolvido em 70 mL de água destilada quente. Após esfriar a solução foi adicionado 20 mL de ácido clorídrico concentrado e de água destilada até o volume de 100mL.

A solução B foi produzida a partir de 0,6 g de alfa-naftalamina dissolvido em 20 mL de água destilada e 1mL de ácido clorídrico. O volume foi completado com água destilada até 100 ml.

A solução C foi produzida com 16,4 g de  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  em água destilada no volume de 100mL.

Após a mistura de partes iguais das três soluções, o reagente de Griess foi acrescentado nos orifícios de uma placa de 96 orifícios. A seguir, o mesmo volume das amostras de saliva foi acrescentado. A leitura utilizou o leitor de ELISA em comprimento de onda 520 nm.

Para o cálculo da concentração do nitrito, foram utilizadas amostras padrão de nitrito de 100mM a 0,32mM, constituindo uma curva padrão.

#### **4.8 Análise Estatística**

Os dados foram armazenados num banco de dados e posteriormente submetidos a procedimentos de análise estatística através do Software Graphpad 4.0. Foram utilizados os testes estatísticos adequados para o perfil de resultados encontrados. Todas as discussões no presente trabalho foram realizadas no nível de 5% significância.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Perfil epidemiológico dos pacientes

Dos 26 pacientes com sepse, 12 eram do sexo feminino (46,15%) e 14 do sexo masculino (53,85%), com média de idade de  $63,81 \pm 3,48$  anos. Os 26 pacientes do grupo controle apresentavam a mesma distribuição em relação ao sexo, com média de  $65,04 \pm 4,07$  anos de idade, não diferindo estatisticamente do grupo com sepse ( $p=0,82$ ).

Todos os pacientes do grupo com sepse (100%) apresentavam boa higiene oral, e quanto às condições dentárias, 57,69% eram desdentados, 34,62% apresentavam dentição total e 7,69% dentição parcial. A doença periodontal estava presente em 7,69% destes pacientes. Quanto às condições bucais do grupo controle, também os 100% dos pacientes apresentavam boa higiene, 57,69% eram desdentados, 38,46% eram dentados totais e 3,85% apresentavam dentição parcial. A doença periodontal estava presente em 15,38% destes pacientes.

Dentre os pacientes com sepse, o principal foco infeccioso foi pulmonar (73,08%), seguido de infecção urinária, abdominal e cutânea (7,69%). O tempo médio de internação destes pacientes foi de  $23,96 \pm 3,30$  dias, e na unidade de terapia intensiva de  $18,73 \pm 2,76$  dias. Dos 26 pacientes, 15 (57,69%) já apresentavam esta condição no momento da admissão hospitalar, enquanto 18 (69,23%) desenvolveram sepse no hospital. O tempo médio de sepse foi de  $3,73 \pm 1,48$  dias (Tabela 1).

Tabela 1- Perfil dos pacientes com sepse: idade, localização do processo infeccioso, condição dentária (DS= desdentado, DP= dentição parcial, DT= dentição total), presença de doença periodontal, momento da apresentação da sepse (A= na admissão hospitalar, H= desenvolvida no hospital), tempo de sepse no momento da coleta salivar (em dias), tempo de internação hospitalar (em dias) e tempo em unidade de terapia intensiva – UTI (em dias)

IDADE	INFECÇÃO	CONDIÇÃO DENTÁRIA	DOENÇA PERIODONTAL	SEPSE	TEMPO DE SEPSE	TEMPO DE H	TEMPO DE UTI
98	PULMONAR	DS	NÃO	A	2	5	5
85	PULMONAR	DS	NÃO	A	5	44	17
66	ABDOMINAL	DS	NÃO	H	4	16	12
46	ABDOMINAL	DT	NÃO	A	4	12	5
32	NEUROLÓGICA	DT	NÃO	A	2	11	6
84	PULMONAR	DS	NÃO	H	7	25	19
84	PULMONAR	DT	SIM	H	5	70	64
49	PULMONAR	DT	NÃO	A	5	54	38
57	PULMONAR	DS	NÃO	H	3	13	13
75	PULMONAR	DP	NÃO	A	2	34	28
71	PULMONAR	DS	NÃO	H	5	45	28
72	PUL/URINARIA	DS	NÃO	A	4	20	14
70	PULMONAR	DP	NÃO	H	4	25	16
82	PULMONAR	DS	NÃO	H	5	13	7
88	PULMONAR	DS	NÃO	H	7	46	44
79	PULMONAR	DS	NÃO	H	2	10	7
67	PULMONAR	DT	NÃO	A	2	32	29
82	PULMONAR	DS	NÃO	A	3	29	26
24	URINARIA	DT	SIM	A	2	8	8
62	PULMONAR	DS	NÃO	A	2	3	3
72	PULMONAR	DS	NÃO	H	3	17	17
18	CUTÂNEA	DT	NÃO	H	3	19	19
34	PULMONAR	DT	NÃO	A	3	10	9
70	PULMONAR	DS	NÃO	H	5	6	24
75	CUTÂNEA	DS	NÃO	H	4	25	22
49	PERITONIAL	DT	NÃO	A	4	31	7

Já no grupo controle, a maioria não apresentava infecção 21 (80,77%).

Quando presente, o principal foco era pulmonar 4 (15,38%), seguido de urinário 2 (7,69%) e abdominal 1 (3,85%). O tempo de internação médio destes pacientes foi

de  $8,77 \pm 1,78$  dias e na unidade de terapia intensiva de  $5,81 \pm 1,28$  dias, diferindo estatisticamente do grupo com sepse ( $p=0,002$ ,  $p<0,0001$ ) (Tabela2).

Tabela 2- Perfil dos pacientes sem sepse (controle): idade, localização do processo infeccioso quando existente, condição dentária (DS= desdentado, DP= dentição parcial, DT= dentição total), presença de doença periodontal, tempo de internação hospitalar e tempo em unidade de terapia intensiva - UTI

IDADE	INFECÇÃO	CONDIÇÃO DENTÁRIA	DOENÇA PERIODONTAL	TEMPO DE H	TEMPO DE UTI
94	-	DS	NÃO	0	0
85	-	DS	NÃO	7	3
63	ABDOMINAL	DT	NÃO	28	23
40	PULMONAR	DT	NÃO	32	17
39	-	DT	NÃO	3	2
80	-	DS	NÃO	0	0
74	URINARIA/PULMONAR	DT	SIM	17	14
70	-	DS	NÃO	19	14
40	-	DT	NÃO	5	3
57	-	DS	NÃO	0	0
75	-	DS	NÃO	13	11
76	-	DS	NÃO	0	0
70	-	DS	NÃO	7	4
70	-	DS	NÃO	19	14
83	-	DS	NÃO	8	3
74	URINARIA/PULMONAR	DS	NÃO	17	14
60	-	DT	NÃO	0	0
79	PULMONAR	DS	NÃO	9	6
38	-	DT	SIM	9	5
57	-	DP	SIM	0	0
74	-	DS	NÃO	14	6
19	-	DT	SIM	12	8
48	-	DT	SIM	0	0
69	-	DS	NÃO	0	0
71	-	DS	NÃO	0	0
54	-	DT	NÃO	9	4

Com relação à etiologia das infecções apresentadas pelos pacientes com sepse, o principal micro-organismo isolado das amostras foi *Acinetobacter* (41,18%), seguido de *Klebsiella* (35,29%) e *Staphylococcus aureus* (23,53%).

Todos os pacientes com sepse fizeram uso de antibióticos, já que fazia parte do protocolo de atendimento destes pacientes. A média de uso foi de 8,39 dias. No grupo controle, 16 (61,54%) fizeram uso de antibióticos, com tempo médio de uso 2,6 dias.

Em relação à ventilação mecânica, 17 pacientes com sepse (65,38%) tiveram necessidade deste procedimento tardiamente, enquanto 4 (15,38%) receberam ventilação precocemente e em 5 (19,23%) pacientes ela não foi necessária. Dos 26 pacientes com sepse, 10 (38,46%) foram a óbito.

No grupo controle, a ventilação mecânica tardia foi necessária em 3 pacientes (11,54%), a precoce em 5 (19,23%) e 18 (69,23%) não necessitaram de ventilação mecânica. Dos 26 pacientes sem sepse, 1 (3,85%) foi à óbito.

## **5.2 Análise dos biomarcadores salivares**

Após a obtenção dos resultados de concentração de PCR da saliva dos pacientes, aplicou-se o teste de normalidade D'Agostino & Pearson e observou-se que as amostras do grupo com sepse e do grupo controle não apresentavam distribuição normal ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,0002$ , respectivamente). Após a aplicação do teste não paramétrico Mann Whitney para comparação das amostras, não foi observada diferença estatística entre os grupos estudados ( $p = 0,2356$ ) (Figura 1).

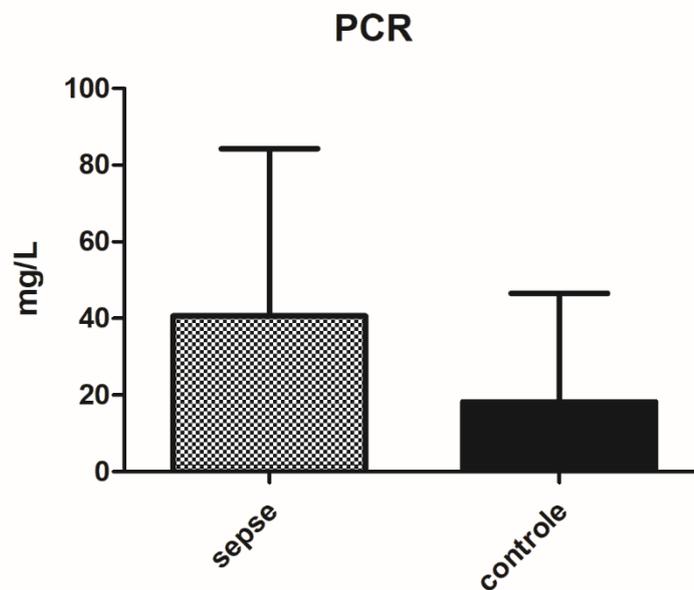


Figura 1- Concentração de proteína C -reativa (em mg/L) na saliva de pacientes com sepse e sem sepse (controle), internados em Hospital Regional. ( $p=0,2356$ )  
PCR= proteína C -reativa

Após a análise da PCT na saliva dos pacientes, observou-se que ambos os grupos não apresentavam uma distribuição normal após a aplicação do teste de normalidade D'Agostino & Pearson ( $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ), e então o teste não paramétrico Mann Whitney foi aplicado para comparação das amostras. Embora a média da concentração de PCT tenha se mostrado superior no grupo com sepse, esta diferença não apresentou significância estatística ( $p=0,1786$ ) (Figura 2).

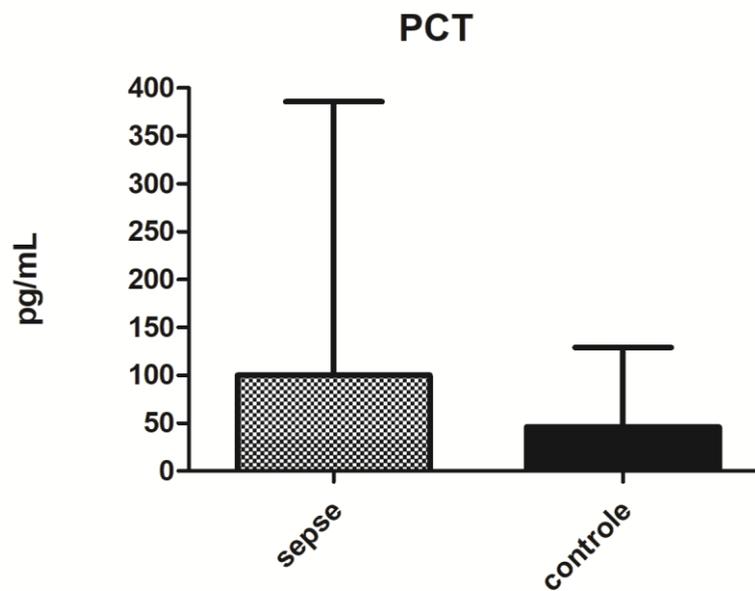


Figura 2- Concentração de procalcitonina (em mg/L) na saliva de pacientes com sepsis e sem sepsis (controle), internados em Hospital Regional. ( $p=0,1786$ ). PCT= procalcitonina

Com relação aos resultados das concentrações de IL-6 na saliva dos pacientes, as amostras de ambos os grupos também não apresentaram uma distribuição normal D'Agostino & Pearson ( $p=0,0303$ ,  $p<0,0001$ ), mas quando aplicado o teste de comparação Mann Whitney verificou-se que o grupo sepsis apresentou concentrações de IL-6 estatisticamente superiores ao grupo controle ( $p=0,0001$ ) (Figura 3).

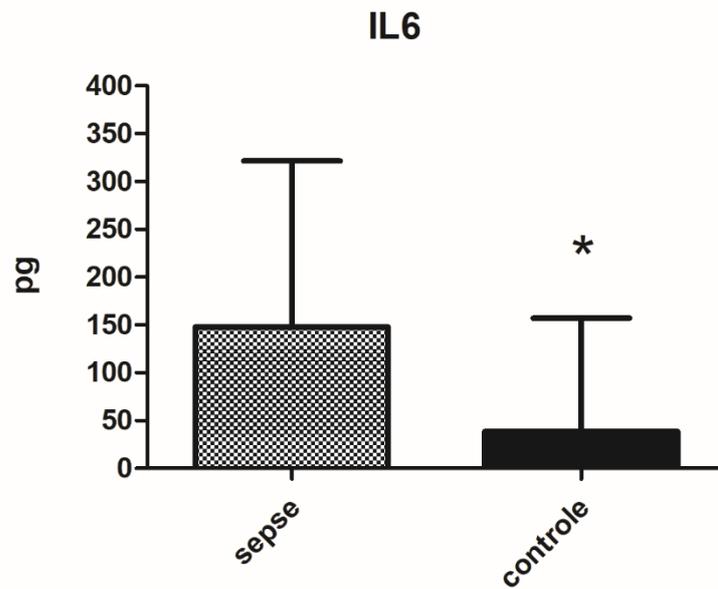


Figura 3- Concentração de IL-6 (em mg/L) na saliva de pacientes com sepse e sem sepse (controle), internados em Hospital Regional. ( $p=0,0001$ ).  
IL6= interleucina 6

Após a análise do ON na saliva dos pacientes, observou-se que ambos os grupos não apresentavam uma distribuição normal após a aplicação do teste de normalidade D'Agostino& Pearson ( $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ), e então o teste não paramétrico Mann Whitney foi aplicado para comparação das amostras. Embora a média da concentração de ON mostrou-se superior no grupo com sepse, esta diferença não apresentou significância estatística ( $p=0,1786$ ) (Figura 4).

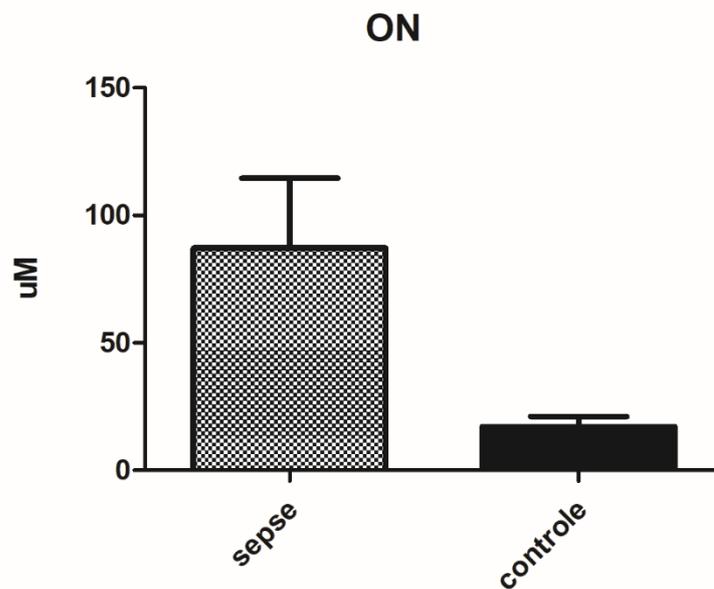


Figura 4- Concentração de óxido nítrico (em mg/L) na saliva de pacientes com sepse e sem sepse (controle), internados em Hospital Regional. ( $p=0,1786$ )  
ON= óxido nítrico

Correlacionando os dados dos pacientes com os valores de PCR, PCT, IL-6 e ON, observou-se que somente IL-6 apresentou correlação significativa com a presença de sepse ( $p<0,001$ ), corroborando as análises anteriores, e também com infecção e tempo de UTI ( $p=0,005$ ,  $p=0,036$ ). Também observou-se correlação significativa entre sepse x infecção, sepse x tempo de hospital e sepse x tempo de UTI, infecção x tempo de hospital e infecção x tempo de UTI, tempo de sepse x tempo de hospital, idade x condição dentária, condição dentária x doença periodontal. Nas tabelas 3 e 4 podemos encontrar as matrizes com os coeficientes da correlação de Spearman e os valores de  $p$ , respectivamente.

Tabela 3- Coeficientes de Spearman das correlações dos níveis de proteína C reativa (PCR), procalcitonina (PCT), IL-6 e oxído nítrico (ON) das amostras de saliva dos pacientes hospitalizados com os dados obtidos: idade (ID), presença de sepse (SP), de infecção (INF), condições dentárias (CD), presença de doenças periodontal (DP), tempo de sepse (TSP), tempo de hospitalização (HOS) e tempo de UTI (UTI). Em negrito encontram-se os valores estatisticamente significantes

	PCR	PCT	IL-6	ON	ID	SP	INF	CD	DP	TSP	HOS	UTI
CR		0,109	-0,141	0,082	-0,002	0,167	0,192	0,105	-0,130	0,384	0,203	0,172
CT	0,109		-0,167	-0,023	-0,084	0,017	0,039	0,005	-0,258	-0,182	0,055	0,013
IL-6	-0,141	-0,167		0,071	0,063	<b>0,562</b>	<b>0,390</b>	-0,023	0,118	0,119	0,233	<b>0,298</b>
ON	0,082	-0,023	0,070		-0,147	0,190	0,168	0,175	0,049	-0,344	0,049	0,045
ID	-0,002	-0,084	0,063	-0,147		0,068	0,081	<b>-0,697</b>	-0,252	0,352	0,136	0,136
SP	0,167	0,017	<b>0,562</b>	0,190	0,068		<b>0,823</b>	-0,016	-0,169		<b>0,523</b>	<b>0,594</b>
INF	0,192	0,039	<b>0,390</b>	0,168	0,081	<b>0,823</b>		0,066	-0,135		<b>0,641</b>	<b>0,709</b>
CD	0,105	0,005	-0,023	0,175	<b>-0,697</b>	-0,016	0,066		<b>0,450</b>	-0,225	0,111	0,059
DP	-0,130	-0,258	0,118	0,049	-0,252	-0,169	-0,135	<b>0,450</b>		-0,030	-0,104	-0,070
TSP	0,384	-0,182	0,119	-0,344	0,352			-0,225	-0,030		<b>0,519</b>	<b>0,445</b>
HOS	0,203	0,055	0,233	0,049	0,136	<b>0,523</b>	<b>0,641</b>	0,111	-0,104	<b>0,519</b>		<b>0,914</b>
UTI	0,172	0,013	<b>0,298</b>	0,045	0,136	<b>0,594</b>	<b>0,709</b>	0,059	-0,070	<b>0,445</b>	<b>0,914</b>	

Tabela 4- Valores de p das correlações dos níveis de proteína C reativa (PCR), procalcitonina (PCT), IL-6 e óxido nítrico (ON) das amostras de saliva dos pacientes hospitalizados com os dados obtidos: idade (ID), presença de sepse (SP), de infecção (INF), condições dentárias (CD), presença de doenças periodontal (DP), tempo de sepse (TSP), tempo de hospitalização (HOS) e tempo de UTI (UTI). Em negrito encontram-se os valores estatisticamente significantes

	PCR	PCT	IL-6	ON	ID	SP	INF	CD	DP	TSP	HOS	UTI
CR		0,442	0,328	0,564	0,987	0,236	0,172	0,460	0,357	0,053	0,150	0,223
CT	0,442		0,247	0,872	0,554	0,905	0,785	0,970	0,065	0,374	0,697	0,927
IL-6	0,328	0,247		0,627	0,662	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,005</b>	0,874	0,415	0,570	0,104	<b>0,036</b>
ON	0,564	0,872	0,627		0,299	0,178	0,233	0,214	0,731	0,085	0,728	0,749
ID	0,987	0,554	0,662	0,299		0,632	0,568	<b>&lt;0,001</b>	0,072	0,078	0,335	0,338
SP	0,236	0,905	<b>&lt;0,001</b>	0,178	0,632		<b>&lt;0,001</b>	0,909	0,231		<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
INF	0,172	0,785	<b>0,005</b>	0,233	0,568	<b>&lt;0,001</b>		0,642	0,341		<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
CD	0,460	0,970	0,874	0,214	<b>&lt;0,001</b>	0,909	0,642		<b>0,001</b>	0,269	0,434	0,675
DP	0,357	0,065	0,415	0,731	0,072	0,231	0,341	<b>0,001</b>		0,886	0,465	0,623
TSP	0,053	0,374	0,570	0,085	0,078			0,269	0,886		<b>0,007</b>	<b>0,023</b>
HOS	0,150	0,697	0,104	0,728	0,335	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,434	0,465	<b>0,007</b>		<b>&lt;0,001</b>
UTI	0,223	0,927	<b>0,036</b>	0,749	0,338	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,675	0,623	<b>0,023</b>	<b>&lt;0,001</b>	

## 6 DISCUSSÃO

A incidência, prevalência e mortalidade da sepse em UTI são elevadas no Brasil. Estudo recente multicêntrico nacional demonstrou que a incidência de sepse foi de 36,3 casos por dia para cada mil pacientes e a mortalidade observada foi de 55,7%. Os dados variaram consideravelmente e estavam associados ao acesso a recursos e tratamento adequados, demonstrando a necessidade de se estabelecer programas visando a prevenção da sepse, o diagnóstico precoce e o tratamento adequado (Machado et al., 2017).

No presente trabalho, a mortalidade verificada no grupo com sepse foi de 38,46% mais elevada que o grupo controle, entretanto mais baixa que a reportada no estudo nacional. Esta diferença em relação ao estudo nacional se deve, provavelmente, ao diagnóstico mais precoce e as melhores condições e acesso à saúde na região do presente estudo. Já a diferença em relação ao grupo controle era esperada, já que a presença de sepse inclui manifestações sistêmicas e apresentação de disfunções orgânicas, que elevam o risco de óbito do paciente. Não só a mortalidade foi superior no grupo com sepse, mas o tempo de internação hospitalar e em UTI, também sugerindo uma maior gravidade do quadro apresentado por estes pacientes.

Neira et al.(2018), relataram as características dos pacientes que apresentaram sepse no serviço público brasileiro durante o período de 2006 a 2015. Durante este período, a proporção média de casos para pacientes do sexo masculino foi de 52,3%. Em relação à idade, o grupo de adultos (de 18 a 64 anos) apresentou a maior proporção de sepse, que representou 32,5% dos casos, seguido

pelo grupo crianças / adolescentes (de 0 a 17 anos) com 29,8% dos casos. A idade média dos pacientes foi de 45,2 anos.

No presente estudo, o perfil do paciente com sepse se mostrou similar ao de Neira et al. (2018), uma vez que a maioria era do sexo masculino (>50%). Entretanto, a média de idade mostrou-se superior, uma vez que não houve a inclusão de crianças e adolescentes, haja vista que os pacientes participantes foram selecionados em uma UTI de adultos.

Zanon et al. (2008), estudando também pacientes com sepse de instituições brasileiras, observaram uma média de idade de mais de 60 anos, que se assemelhou ao do presente estudo, e verificaram que o foco infeccioso mais prevalente também foi o pulmonar. Dentre os patógenos encontrados, em ambos os estudos, destacaram-se *Acinetobacter* (53,0% vs 41,0%, respectivamente) e *Staphylococcus aureus* (>20% em ambos).

Da mesma forma, Baykara et al. (2018) estudando pacientes internados em diferentes UTIs da Turquia, verificaram que a principal etiologia das infecções em UTI foi *Acinetobacter* (33,7%), seguido de *Pseudomonas* (16,4%) e *Klebsiella* (16%). Além das semelhanças entre os focos infecciosos e as etiologias, o estudo demonstrou altas taxas de sepse naquele país comparadas ao estudo de Machado et al. (2017), sugerindo condições de saúde semelhantes as do Brasil.

Em relação à etiologia, de fato *Acinetobacter*, *Pseudomonas* spp., *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* são patógenos comuns de pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAV), principal infecção apresentada pelos pacientes com sepse do presente estudo e de outros diferentes estudos (Patil & Patil, 2017; Sistla et al., 2009; Sequiera, 2010).

O uso de ventilação mecânica na unidade de terapia intensiva (UTI) é frequente e expõe os pacientes ao risco de desenvolver pneumonia e consequentemente sepse. Em UTI, a incidência de PAV representa 9% a 27% das intubações orotraqueais (American Thoracic Society, 2005).

Em relação à higiene oral dos pacientes estudados, observou-se que todos apresentavam boa higiene, tanto no grupo com sepse, quanto no grupo controle. Este fato se deve à existência de um protocolo de higiene oral estabelecido no Hospital de estudo, com o objetivo de evitar e reduzir as infecções e complicações relacionadas a pobre higiene oral e melhorar as condições gerais dos pacientes.

Duval et al. (2017), ao comparar os hábitos de higiene bucal, condição oral e procedimentos odontológicos em pacientes com endocardite infecciosa (EI), concluíram que pacientes com EI causados por estreptococos orais, apresentam resultados diferentes de pacientes com EI causados por patógenos não orais em relação a características de base, hábitos de higiene bucal e procedimentos odontológicos recentes, evidenciando que a higiene bucal poderia interferir no risco e na etiologia da infecção.

Ainda sobre, Rodriguez et al. (2017), concluíram em um ensaio clínico que há um aumento significativo das bactérias Gram negativas no fluido salivar nos pacientes sem cuidados bucais, corroborando a importância da higiene bucal na presença de micro-organismos na cavidade bucal.

As condições dentárias dos grupos do presente estudo também mostraram-se semelhantes e a doença periodontal estava presente em 8% e 15% dos pacientes com sepse e controle, respectivamente. Tais perfis semelhantes apresentados pelos grupos estudados e a baixa frequência de doença periodontal, foram favoráveis ao

estudo, visto que as condições bucais e dentárias, que poderiam alterar os níveis de marcadores inflamatórios na saliva, provavelmente tiveram mínima interferência nos resultados encontrados. Além disso, quando realizada a análise de correlação entre estes parâmetros e os níveis dos marcadores inflamatórios, não foi observada correlação estatisticamente significativa.

A saliva é um fluido corporal que desempenha um importante papel no organismo, tanto nas funções fisiológicas, quanto nas patológicas. Esse fluido vem sendo cada vez mais utilizado no diagnóstico e no monitoramento de doenças, mostrando excelente correlação com as condições sistêmicas e marcadores séricos. Williamson et al. (2012), realizaram uma comparação entre IL-6 e a PCR, salivares e séricas, observaram elevada correlação entre eles. Slavish et al. (2015), em uma revisão de estudos publicados sobre os níveis de biomarcadores em amostras salivares, concluíram que embora a PCR da saliva tenha sido associada à PCR em sangue circulante de forma consistente, outros biomarcadores não puderam ser correlacionados de maneira confiável.

Os marcadores inflamatórios estudados (PCR, PCT, IL-6 e ON) possuem aplicabilidades diversas no diagnóstico e monitoramento de doenças. A PCR é um dos mais comuns marcadores, principalmente para diagnosticar a presença e a gravidade da inflamação. A PCT tem mostrado alta confiabilidade no diagnóstico precoce de sepse, sepse grave ou choque séptico, a IL-6 se correlaciona com as respostas imunes do organismo e sua quantificação auxilia na identificação da inflamação, e o Óxido Nítrico está envolvido em inúmeros processos fisiológicos e pode ser utilizado para identificação da existência de patógenos no organismo

(Jorjão, 2012, Angeletti et al., 2015). Entretanto um marcador específico de sepse na saliva ainda não foi identificado.

No presente estudo, embora as médias das concentrações de todos os marcadores tenham sido maiores no grupo com sepse, somente a IL-6 mostrou-se estatisticamente superior neste grupo. Além disso, somente IL-6 mostrou correlação significativa com infecção, obrigatoriamente presente nos casos de sepse. É importante destacar que embora os pacientes do grupo controle não apresentassem sepse e apresentassem condições bucais semelhantes aos pacientes com sepse, também estavam hospitalizados, por diferentes causas como trauma, infarto, tumor e até mesmo infecção. Qualquer uma destas condições está associada ao desenvolvimento de um processo inflamatório, com possível elevação dos marcadores estudados. Isto poderia justificar a ausência de significância estatística para análise de PCR, PCT e ON, e sugerir uma baixa confiabilidade na utilização destes marcadores salivares para o diagnóstico específico de sepse.

Especificamente no que se refere aos valores de PCT, como mencionado anteriormente, alguns trabalhos têm mostrado alta confiabilidade no diagnóstico precoce de sepse, sepse grave ou choque séptico e alta especificidade para presença de infecção. A falta de significância observada nos resultados do presente trabalho sugere que, provavelmente, os níveis salivares de PCT não apresentam a mesma importância diagnóstica que os níveis séricos.

Da mesma forma, Surti et al. (2018) relataram que nem o valor único nem os valores sequenciais da PCT foram úteis para diagnosticar ou prognosticar a sepse em pacientes no pós-operatório imediato. Além disso, PCT foi menos acessível em comparação com outros parâmetros hematológicos simples, como contagem de

leucócitos e plaquetas. Apesar disso, Cabral et al. (2018) verificaram que a PCT sérica refletia a gravidade do quadro infeccioso em pacientes queimados com sepse, demonstrando um bom potencial como marcador prognóstico.

Já o encontro de significância estatística na análise de IL-6 do presente trabalho, sugere um potencial uso desta citocina para seu diagnóstico específico na saliva. Da mesma forma, Neunhoeffler et al. (2016) reconheceram IL-6 como um marcador sérico precoce de infecções bacterianas graves com alta sensibilidade. Para os autores, a IL-6 associada a PCR foram os marcadores mais confiáveis para a discriminação entre SIRS e sepse em períodos pós-operatórios.

Nakstad (2018) destacou o potencial de IL-6 para melhorar o manejo de neonatos em risco de sepse. O autor encontrou níveis de IL-6 4,5 vezes maiores em neonatos com sepse precoce, quando comparados com os níveis plasmáticos de neonatos não infectados. Entretanto para Lamping et al. (2018), a combinação de quatro parâmetros clínicos e quatro parâmetros laboratoriais, incluindo IL-6, revelou maior acurácia na identificação completa dos casos de sepse, podendo reduzir potencialmente o uso de antibióticos em 30% em casos de SIRS não infecciosas.

Apesar dos resultados do presente trabalho apresentarem significância, faz-se necessário mencionar as limitações encontradas no estudo como forma de subsidiar o planejamento de novas pesquisas sobre o tema. Dentre as principais limitações está a possibilidade dos pacientes incluídos no grupo teste não apresentarem de fato sepse, já que o diagnóstico deste quadro representa um enorme desafio para os clínicos. Também a variação do momento de obtenção das amostras, sendo desejável o estudo de pacientes com mesmo tempo de sepse e o mais precoce possível a fim de evitar a influência de alterações transitórias dos

mediadores inflamatórios e buscar o melhor, o mais específico e o mais precoce marcador.

## 7 CONCLUSÃO

Conclui-se que:

- Os níveis salivares de PCR, PCT e ON dos pacientes com sepse não diferiram estatisticamente dos pacientes hospitalizados sem sepse;

- Pacientes com sepse apresentaram níveis de IL-6 significativamente superiores na saliva quando comparados com pacientes hospitalizados sem sepse.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Latino Americano (ILAS). Implementação De Protocolo Gerenciado De Sepse Protocolo Clínico: atendimento ao paciente adulto com sepse / choque séptico. Revisado em: junho de 2017 [acesso em 14 out. 2017]. Disponível em: <http://www.ilas.org.br/assets/arquivos/ferramentas/protocolo-de-tratamento.pdf>
2. Mariansdatter SE, Eiset AH, Søgaaard KK, Christiansen CF. Differences in reported sepsis incidence according to study design: a literature review. *Medical Research Methodology* 2016; 16: 1-13.
3. Associação Médica Brasileira [homepage na internet]. Sepse mata mais que infarto e câncer de mama e intestino [acesso em 14 out. 2017]. Disponível em: <https://amb.org.br/noticias/sepse-mata-mais-que-infarto-e-cancer-de-mama-e-intestino-profissionais-se-reunem-em-sao-paulo-para-discutir-o-tema-2/>.
4. Molnár Z, Bourboulis EJG , Kumar A, Nierhaus A. Sepsis: Diagnostic and Therapeutic Challenges. *Bio Medical Research International* 2016; 1: 1-2.
5. Zavariz SMR, Leite CE, Pires MGS, Oliveira JR, Nunes FB. Marcadores laboratoriais do choque séptico. *Laboratory Marker sof the septics hock* 2006; 16: 29-37.
6. Javid MA, Ahmed AS, Durant R, Tran SD. Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. *Journal of oral biology and craniofacial research* 2016; 1:66-75.

7. Zhang CZ, Cheng XQ, Li JY, Zhang P, Yi P, Xu X, Zhou XD. Saliva in the diagnosis of diseases. *International Journal of Oral Science* 2016; 8: 133-137.
8. Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. Detection of inflammatory biomarkers in saliva and urine: Potential in diagnosis, prevention, and treatment for chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine* 2016; 2: 783-799.
9. Mello RCV, Sad EF, Andrade BC, Neves SPF, Santos SME, Sarquis MMS, Marik PE, Dias EP. Serum and salivary cortisol in the diagnosis of adrenal insufficiency and as a predictor of the outcome in patients with severe sepsis. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 2011; 7: 455-459.
10. Klouwenberg PMCK, Cremer OL, Vught LA, Frencken JF, Schultz MJ, Bonten MJ, Poll TV. Likelihood of infection in patients with presumed sepsis at the time of intensive care unit admission: a cohort study. *Journal Critical Care* 2015; 19: 1-8.
11. Pugin J, Meisner M, Léon A, Gendrel D, López AF. Guide for the Clinical Use of Procalcitonin. *Journal Thermo Scientific* 2012; 1:1-8.
12. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Har M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, Poll DV, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Clinical Review & Education Special Communication* 2016; 8: 801-810.

13. Batista RS, Gomes AP, Lima LC, Vitorino RR, Perez MCA, Mendonça EG, Oliveira MGA, Geller M. Sepsis: atualidades e perspectivas. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* 2011; 2: 207-216.
14. Wiewel MA, Harmon MB, Vught LAV, Scicluna BP, Hoogendijk AJ, Horn J, Zwinderman AH, Cremer OL, Bonten MJ, Schultz MJ, Poll TVD, Juffermans NP, Wiersinga J. Risk factors, host response and outcome of hypothermic sepsis. *Journal Critical Care* 2016; 20: 1-9.
15. Machado FR, Cavalcanti AB, Bozza FA, Ferreira EM, Carrara FSA, Souza JL, Caixeta N, Salomão R, Angus DC, Azevedo LCP. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units, the Sepsis PREvalence Assessment Database (SPREAD): an observational study. *The Lancet Infectious Diseases* 2017; 8: 1-10.
16. Morgado JC. Biomarcadores Salivares no Contexto do Diagnóstico Precoce do Câncer Oral. Porto. Monografia [Mestrado Integrado de Medicina Dentária] – Faculdade de Medicina Dentária Universidade do Porto; 2015.
17. Ganesan P, Shanmugam P, Sattar SBA, Shanlar SL. Evaluation of IL-6, CRP and hs-CRP as Early Markers of Neonatal Sepsis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2016; 5: 13-17.
18. Volp ACP, Alfenas RCG, Costa NMB, Minim VPR, Stringueta PC, Bressan J. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 2008; 3: 537-549.

19. Mally P, Xu J, Hendricks-Muñoz KD. Biomarkers for neonatal sepsis: recent developments. *Research and Reports in Neonatology* 2014; 4: 157-68.
20. Lanziotti VS, Póvoa P, Soares M, Lapa-Silva JR, Barbosa AP, Salluh JIF. Use of biomarkers in pediatric sepsis: literature review. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* 2016; 4: 472-482.
21. Angeletti S, Dicuonzo G, Fioravanti M, Cesaris M, Fogolari M, Presti AL, Ciccozzi M, Florio L. Procalcitonin, MR-Proadrenomedullin, and Cytokines Measurement in Sepsis Diagnosis: Advantages from Test Combination. *Journal Disease Markers* 2015; 1:1-14.
22. Sager R, Kutz A, Mueller B, Schuetz P. Procalcitonin-guided diagnosis and antibiotic stewardship revisited. *Journal BMC Medicine* 2017; 15: 1-11.
23. Cabral L, Afreixo V, Almeida L, Paiva J A .The Use of Procalcitonin (PCT) for Diagnosis of Sepsis in Burn Patients: A Meta- Analysis. *Journal Plos One* 2018; 11: 1-16.
24. Patel N, Belcher J, Thorpe G, Forsyth N, Spiteli M. Measurement of C-reactive protein, procalcitonin and neutrophil elastase in saliva of COPD patients and healthy controls: correlation to self-reported wellbeing parameters. *Respiratory Research* 2015; 16: 62-65.
25. Hendek MK, Erdemir EO, Kisa U. Evaluation of salivary procalcitonin levels in different periodontal diseases. *Journal of periodontology* 2015; 6: 820-826.
26. Pérez SB, Rodríguez-Fanjul J, García IJ, Hernando JM, Sanz MI. Procalcitonin Is a Better Biomarker than C-Reactive Protein in Newborns Undergoing Cardiac

- Surgery: The PROKINECA Study. *Journal Biomarker Insights* 2016; 11: 126-129.
27. Mokline A, Garsallah L, Rahmani I, Oueslati JH, Tlaili S, Hammouda R, Gasri B, Messadi AA. Procalcitonin: A Diagnostic And Prognostic Biomarker Of Sepsis In Burned Patients. *Annals of Burns and Fire Disasters* 2015; 2: 115-120.
28. Peschanski N, Chenevier-Gobeaux C, Mzabi L, Rémy L, Ouahabi S, Aquilina V, Brunel V, Lefevre G, Ray P. Prognostic value of PCT in septic emergency patients. *Journal Intensive Care* 2016; 6: 1-9.
29. Stoma I, Karpov I, Uss A, Rummo O, Milanovich N, Iskrov I. Diagnostic value of sepsis biomarkers in hematopoietic stem cell transplant recipients in a condition of high prevalence of gram-negative pathogens. *Hematology Oncology and Stem Cell Therapy* 2016; 1: 1-7.
30. Sbrana A, Torchio M, Comolli G, Antonuzzo A, Danova M. Use of procalcitonin in clinical oncology: a literature review. *New Microbiologica* 2016; 3: 174-180.
31. Fukumura, D., Kashiwagi, S., Jain R.K. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nature Reviews Cancer* 2006; 6: 521–534.
32. Jorjão, A L. Efeitos do *Lactobacillus hamnosus* e seus produtos sobre a liberação de mediadores pró e anti-inflamatórios em macrófagos de Camundongo. 2012. 62 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, 2012.
33. Aranke M, Bryan NS, Mian IA. Towards nitric oxide based diagnostics: call to action. *Trends in Molecular Medicine* 2011; 11: 614-618.

34. Sundar NM, Krishnan V, Krishnaraj S, Hemalatha VT, Nazish MDA. Comparison of the Salivary and the Serum Nitric Oxide Levels in Chronic and Aggressive Periodontitis: A Biochemical Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2013; 6: 1223-1227.
35. Bretas LP, Rocha ME, Vieira MS, Rodrigues ACP. Fluxo Salivar e Capacidade Tamponante da Saliva como Indicadores de Susceptibilidade à Doença Cárie. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada* 2008; 3: 289-293.
36. Lima DP, Correia ASC, Anjos AL, Boer NP. O uso da saliva para diagnóstico de doenças orais e sistêmicas. *Revista Odontológica de Araçatuba* 2014; 1: 55-59.
37. Helmerhorst EJ, Dawes C, Oppenheim FG. The complexity of oral physiology and its impact on salivary diagnostics. *Journal Oral diseases* 2018; 3: 363-371.
38. Ding Y, Ma Q, Liu F, Zhao L, Wei W. The Potential Use of Salivary miRNAs as Promising Biomarkers for Detection of Cancer: A Meta-Analysis. *Plos One Journal* 2016; 1: 1-12.
39. Dezayee ZM, AlNimer MS. Saliva Creactive protein as a biomarker of metabolic syndrome in diabetic patients. *Indian Journal Dent al Research* 2016; 4: 388-391.
40. Elbuken G, Karaca Z, Tanriverdi F, Unluhizarci K, Sungur M, Doganay, Kelestimur. Comparison of total, salivary and calculated free cortisol levels in patients with severe sepsis. *Journal of Intensive Care* 2016; 3: 3-10.

41. Singh SN, Rathia SK, Awasthi S, Singh A, Bhatia V. Salivary Cortisol Estimation to Assess Adrenal Status in Children with Fluid Unresponsive Septic Shock. *Indian Pediatrics Journal* 2013; 15: 681-684.
42. Neira RAQ, Hamacher S, Japiassuã AM. Epidemiology of sepsis in Brazil: Incidence, lethality, costs, and other indicators for Brazilian Unified Health System hospitalizations from 2006 to 2015. *Journal Plos One* 2018; 4: 1-15.
43. Zanon F, Caovilla JJ, Michel RS, Cabeda EV, Ceretta DF, Luckemeyer GD, Beltrame C, Posenatto N. Sepsis in the Intensive Care Unit: Etiologies, Prognostic Factors and Mortality. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* 2008; 2: 128-134.
44. Baykara N, Akalın H, Arslantaş MK, Hancı V, Çağlayan C, Kahveci F, Demirağ K, Baydemir C, Ünal N. Epidemiology of sepsis in intensive care units in Turkey: a multicenter, point-prevalence study. *Critical Care* 2018; 22: 1-14.
45. Patil HV, Patil VC. Incidence, bacteriology, and clinical outcome of ventilator associated pneumonia at tertiary care hospital. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine* 2017; 1:46-55.
46. Sistla SJNM, Dutta TK, Badhe AS, Parija SC. Ventilator-associated pneumonia in a tertiary care hospital in India: Incidence and risk factors. *The Journal Infect Developing Countries* 2009; 3: 771–777.
47. Sequiera AGP. Antimicrobial sensitivity pattern among organisms which were isolated from the endotracheal aspirates of patients with ventilator associated pneumonia. *Journal Clinical Diagnostic Res* 2010; 1:3397–3401.
48. American Thoracic Society. Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and

- healthcare-associated pneumonia. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine* 2005; 1:388–416.
- 49.** Duval X, Millot S, Chirouze C, Selton-Suty C, Moby V, Tattevin P, Strady C, Euvrard E, Agrinier N, Thomas D, Hoen B, Alla F. Oral streptococcal endocarditis, oral hygiene habits and recent dental procedures: a case-control study. *Clinical Infectious Diseases* 2017; 12: 1678-1685.
- 50.** Rodriguez BF, Gonzalez MCC, Sanchez FC, Alonso CRP, Romero CA. Oral care in a neonatal intensive care unit. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 2017; 8: 953-957.
- 51.** Williamson S, Munro C, Pickler R, Grap MJ, Elswick Jr RK. Comparison of Biomarkers in Blood and Saliva in Healthy Adults. *Nursing Research and Practice* 2012; 1: 1-4.
- 52.** Slavish DC, Graham-Engeland JE, Smyth JM, Engeland CG. Salivary Markers of Inflammation in Response to Acute Stress. *Brain, Behavior, and Immunity* 2015; 2: 253-269.
- 53.** Surti J, Jain I, Shah K, Mishra A, Kandre Y, Garg P, Shah J, Shah A, Tripathi P. Predictive efficacy of procalcitonin, platelets, and white blood cells for sepsis in pediatric patients undergoing cardiac surgeries who are admitted to intensive care units: Single-center experience. *Annals of pediatric cardiology* 2018; 15: 137-142.
- 54.** Neunhoeffler F, Plinke S, Renk H, Hofbeck M, Fuchs J, Kumpf M, Zundel S, Seitz G. Serum concentrations of Interleukin-6, procalcitonin, and C-reactive protein: discrimination of septic complications and systemic inflammatory response

- syndrome after pediatric surgery. *European Journal of Pediatric Surgery* 2016; 1:180–185.
- 55.** Nakstad B. The diagnostic utility of procalcitonin, interleukin-6 and interleukin-8, and hyaluronic acid in the Norwegian consensus definition for early-onset neonatal sepsis (EONS). *Infection and Drug Resistance* 2018; 1: 359-368.
- 56.** Lamping F, Jack T, Rübsamen N, Sasse M, Beerbaum P, Mikolajczyk RT, Boehne M, Karch A. Development and validation of a diagnostic model for early differentiation of sepsis and non-infectious SIRS in critically ill children - a data driven approach using machine-learning algorithms. *Journal BMC Pediatric* 2018; 15:112-118.

**APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O Sr. (a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa **Marcadores de Sepsis na saliva de pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Regional de Taubaté – SP**”.

**Descrição:** Sepsis 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 pode 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 sepsis requer cuidados médicos imediatos.

Esse estudo tem por objetivo analisar por meio da saliva marcadores inflamatórios em pacientes em sepsis.

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:** não existe nenhum risco em participar do estudo.

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.

Luciana Freitas Galhardo

**(012) 991842551 “INCLUSIVE LIGAÇÕES À COBRAR”**

Eu, \_\_\_\_\_,  
portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa **“Marcadores de Sepsis na saliva de pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva 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 a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura

**APÊNDICE B - Ficha Clínica de Avaliação****Ficha Clínica de avaliação**

Número da inscrição: \_\_\_\_\_

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Gênero: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

Data da entrada \_\_\_\_\_ Data da saída \_\_\_\_\_

Motivo da internação \_\_\_\_\_

Local da infecção \_\_\_\_\_

Tempo de internação \_\_\_\_\_

Entrou com sepse ( ) sim ( ) não

Desenvolveu a sepse no hospital ( ) sim ( ) não

Se sim, em quantos dias internado \_\_\_\_\_

Secreção: sim ( ) não ( )

Alteração radiológica: sim ( ) não ( )

Antibioticoterapia: sim ( ) não ( )

Tempo do uso: \_\_\_\_\_

Houve troca de medicamento: sim ( ) não ( )

Tempo de ventilação mecânica: tardia ( ) precoce ( )

Tipo de microrganismo: \_\_\_\_\_

Dados laboratoriais:

leucograma \_\_\_\_\_

PCR \_\_\_\_\_

Gasometria arterial \_\_\_\_\_

(cálculo da relação da pressão arterial de oxigênio e a fração de oxigênio em uso pelo paciente, para definir se o paciente está em hipóxia grave ou não).

Óbito: sim ( ) não ( )

Condição bucal:

- ( ) Boa: sem biofilme/placa
- ( ) Regular: pouca quantidade de biofilme/placa
- ( ) Ruim: muita quantidade de biofilme/placa
- ( ) Dentado
- ( ) Desdentado
- ( ) Gengivite
- ( ) Periodontite
- ( ) Lesão bucal \_\_\_\_\_

## **CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO**

O plano de trabalho e o cronograma de execução deste projeto foram estabelecidos para uma duração de 12 meses, a saber:

Meses 2017 – 2018	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Revisão de Literatura	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
Desenvolvimento do Projeto	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
Envio a CEP										*		
Avaliação dos pacientes										*	*	*
Análise Laboratorial	*	*										
Resultados e Elaboração do Trabalho			*	*	*							

## **CUSTOS E FOMENTOS**

O trabalho foi desenvolvido com os recursos dos executores, sem custos para instituição. Desta forma, não houve fomentos para o projeto.

## **EXECUTORES DO PROJETO**

Profa. Mariella Vieira Pereira Leão – Orientadora

Dra. Luciana Freitas Galhardo – Cirurgiã Dentista/ Estomatologista – Hospital Regional do Vale do Paraíba, Taubaté/SP

Prof. Dr. Gilson Fernandes Ruivo – Co-orientador

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desta obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Luciana Freitas Galhardo

Taubaté, 16 de agosto de 2018.