

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica

**DOSAGEM SEQUENCIAL DE FATOR DE NECROSE
TUMORAL ALFA, SEUS RECEPTORES SOLÚVEIS E
ENDOTELINA-1 COMO VALOR PREDITIVO DE
MORTALIDADE NO GRANDE QUEIMADO.**

Cyntia Aguiar Ribeiro

Orientadora: Profa. Nadine Clausell

Dissertação de Mestrado

Abril de 2001

R484d **Ribeiro, Cyntia Aguiar**

Dosagem seqüencial de fator de necrose tumoral alfa, seus receptores solúveis e endotelina-1 como valor preditivo de mortalidade no grande queimado / Cyntia Aguiar Ribeiro ; orient. Nadine Causell. – Porto Alegre, 2002.

84 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica.

1. Queimaduras 2. Mortalidade 3. Fator de necrose tumoral/farmacocinética. 4. Endotelina-1/farmacocinética 5. Receptores do fator de necrose tumoral I. Causell, Nadine. II. Título.

NLM: WO 704

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

AGRADECIMENTOS:

Agradeço a todos que me incentivaram nesta trajetória, fazendo com que conseguisse alcançar mais um dos meus objetivos.

Aos colegas da UTI de queimados do Hospital de Pronto Socorro de Porto Alegre: Dr. Fadel, Dr. Adelar, Dr. Rebelo, Dr. Gerson, Dr. Marco, Dra. Sônia e Dra. Márcia e as enfermeiras Vera, Ingrid, Eloisa, Arlete e Irene pelo seu precioso auxílio na coleta de dados.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e, em especial, a estatística Vânia Hirakata pelas orientações na estatística deste trabalho.

À equipe do Laboratório do Hospital de Pronto Socorro onde processei minhas amostras.

À amizade e auxílio das colegas Janete, Karen, Silvia e Rose.

À Dra. Nadine Clausell pela sua objetividade e simplicidade nas orientações para a execução deste trabalho; além da sua genialidade.

Ao Dr. Jarbas de Oliveira por sua incansável boa vontade e pela sua praticidade e ensinamentos na realização dos testes de ELISA.

Aos meus pais pela minha formação e caráter.

Ao Eugênio por estar sempre presente em minha vida.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABELAS	V
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DA LITERATURA	
Epidemiologia	3
Lesão Inalatória	5
Efeitos locais e sistêmicos das queimaduras	7
Reações inflamatórias seguidas as queimaduras.....	9
Citocinas	12
Interleucinas	15
Fator de Necrose Tumoral- α	16
Receptores Solúveis	17
Endotelina.....	20
HIPÓTESE	23
OBJETIVOS	23
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	24
ARTIGO EM PORTUGUÊS	28
RESUMO	29
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	
População em estudo	33
Coleta das amostras de sangue	33

Análise estatística.....	34
RESULTADOS	
Características clínicas dos pacientes.....	35
Níveis plasmáticos de TNF- α	37
Receptores solúveis para o TNF- α	38
Níveis plasmáticos de ET-1	40
Risco relativo, valores preditivos positivos e negativos dos marcadores biológicos	41
Correlação do Apache II e marcadores biológicos	43
Correlação entre variáveis e SCQ	43
DISCUSSÃO	
Características clínicas dos pacientes	44
Níveis circulantes de TNF- α	45
Receptores Solúveis do TNF- α	46
Níveis de ET-1.....	47
Limitações do estudo	48
CONCLUSÕES	49
BIBLIOGRAFIA.....	50
ARTIGO EM INGLÊS.....	53
ANEXOS	76

ABREVIATURAS

TNF-α	fator de necrose tumoral
IL	interleucina
sTNFR1	receptor solúvel 1 do TNF
sTNFR2	receptor solúvel 2 do TNF
ET-1	endotelina-1
SCQ	superfície corporal queimada
PMN	polimorfonucleares
MA	macrófagos alveolares
SDMO	síndrome da disfunção de múltiplos órgãos
SDRA	síndrome do desconforto respiratório agudo
SIRS	síndrome da resposta inflamatória sistêmica
UTI	unidade de tratamento intensivo
HPS	Hospital de Pronto Socorro de Porto Alegre
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Nota: Várias siglas foram mantidas conforme a língua inglesa por serem assim conhecidas universalmente.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DA REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1- Padrão clínico da SDMO	8
Figura 2- Ativação direta e indireta da cascata inflamatória	11
Figura 3- Balanço inflamatório	14

Figuras do artigo em português

Figura 1- Valores plasmáticos da dosagem seqüencial de TNF- α em pacientes queimados.....	37
Figura 2- Valores plasmáticos da dosagem seqüencial de sTNFR1 em pacientes queimados.....	39
Figura 3- Valores plasmáticos da dosagem seqüencial de sTNFR2 em pacientes queimados.....	39
Figura 4- Valores plasmáticos da dosagem seqüencial de ET-1 em pacientes queimados.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características clínicas de sobreviventes e não sobreviventes.....	36
Tabela 2- Risco relativo e valores preditivos e negativos para mortalidade para pontos de corte específicos	42
Tabela 3- Coeficiente de correlação de Pearson entre escore de APACHE II e marcadores biológicos em diferentes pontos no tempo	43
Tabela 4- Coeficiente de correlação de Pearson entre SCQ e marcadores biológicos em diferentes pontos no tempo.....	43

INTRODUÇÃO

Grandes queimaduras são lesões relativamente comuns que requerem tratamento multidisciplinar visando reduzir morbidade e prevenir mortalidade. Em pacientes com grandes áreas queimadas, com uma superfície corporal queimada (SCQ) maior do que 30%, podem ocorrer marcadas alterações cardiovasculares levando ao choque circulatório. Acredita-se que este é um processo complexo envolvendo uma disfunção na microcirculação onde a simples reposição de volume pode não ser suficiente para controlar a deterioração do paciente (1, 2). Além disso, quando ocorre à lesão inalatória, usualmente em 10-20% dos pacientes queimados, a mortalidade pode variar desde 30 até 90% (3). Parece que nesta situação, a reação inflamatória é mais proeminente, o desequilíbrio na distribuição do fluxo sangüíneo é mais grave, o risco de infecções está aumentado e há também um aumento no risco de disfunção de múltiplos órgãos (SDMO) (4).

Mediadores inflamatórios, chamados citocinas, sabidamente estão envolvidos na patogênese da disfunção orgânica em pacientes gravemente enfermos. As citocinas podem ter papéis múltiplos contribuindo para a instabilidade hemodinâmica. Mais especificamente, nós demonstramos recentemente que níveis aumentados de fator de necrose tumoral (TNF)- α quando detectados num momento precoce após o diagnóstico de choque séptico, estão associados a uma mortalidade elevada (5). O TNF- α tem a sua atividade biológica modulada por dois tipos de receptores celulares com peso molecular de 55 e 75kD, sTNFR1 e sTNFR2, respectivamente. Na sepse, parece que a detecção desses receptores solúveis na circulação também seria indicativa de um pior prognóstico (6). Tem sido sugerido que os efeitos cardiodepressores do TNF- α contribuam para um prognóstico sombrio em pacientes com choque séptico (7). Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse no

estudo das citocinas em pacientes queimados, bem como alguns relatos indicando que estes mediadores estão aumentados nesta situação. De fato, níveis aumentados de TNF- α e receptores solúveis do TNF- α tem sido demonstrados em pacientes queimados, porém a sua associação com prognóstico permanece controversa (8, 9, 10).

Além dos mediadores inflamatórios, sabe-se que outros marcadores biológicos também têm um importante papel em pacientes gravemente enfermos (11). As endotelinas são agentes vasoconstritores potentes as quais estão também elevadas na sepse e parecem estar associadas com mortalidade (5). Similarmente aos estudos envolvendo o TNF- α , a endotelina (ET)-1 mostrou-se aumentada em pacientes queimados (12, 13), porém a descrição precisa de um perfil temporal precoce do comportamento da ET-1 inexistente nesta situação. Adicionalmente, não está claramente estabelecido se níveis de ET-1 estão relacionados à morbidade e mortalidade em pacientes queimados (12, 13).

Como uma rápida deterioração clínica com uma alta taxa de mortalidade são temidas em pacientes queimados, a identificação de marcadores precoces de prognóstico reservado pode ajudar a guiar medidas terapêuticas diferenciadas que possam trazer benefícios no manejo clínico desses pacientes. Neste estudo, nós procuramos investigar o perfil seqüencial e precoce de níveis circulantes de TNF- α , seus receptores solúveis e ET-1 em pacientes queimados com SCQ \geq 30%, sendo que a primeira amostra de sangue foi coletada dentro de 6 horas após o acidente e de maneira seriada a cada 6h nas primeiras 24h.

REVISÃO DA LITERATURA

Nos Estados Unidos é estimado 2,5 milhões de pessoas/ano sofram queimaduras. Mais de 100.000 pacientes queimados são hospitalizados anualmente, e 12.000 morrem vítimas de suas queimaduras. A cada ano morrem mais americanos por incêndio do que por todos os desastres naturais combinados (1).

No nosso meio a média de internação hospitalar, nos últimos três anos, por queimaduras no Hospital de Pronto Socorro de Porto Alegre (HPS) foi de 268 internações por ano com uma média anual de 32 óbitos (dados não publicados).

O cuidado com as vítimas de queimadura tem progredido muito nos últimos 50 anos. Antes da Segunda Guerra Mundial, pacientes com menos de 30% de SCQ apresentavam uma mortalidade de 50%. Hoje, para esta mortalidade a SCQ elevou-se para 65-75%. Esses avanços na sobrevivência dos queimados são devidos a múltiplos fatores, incluindo: **1.** um melhor entendimento da fisiopatologia da queimadura; **2.** melhora na ressuscitação volêmica para prevenir o desenvolvimento do choque e da insuficiência renal aguda; **3.** o desenvolvimento de agentes antimicrobianos tópicos, tais como a sulfadiazina de prata e o acetato de mafenide, para reduzir a incidência de infecções na queimadura; **4.** o desenvolvimento e implementação de melhores métodos de suporte nutricional para otimizar a cicatrização da ferida e aumentar a resistência às infecções e **5.** o entendimento de que a remoção cirúrgica precoce da escara necrótica da queimadura com enxertia precoce, encurta o período de estresse fisiológico (2).

Contudo, queimaduras ainda permanecem com uma mortalidade muito elevada. Somente acidentes automobilísticos causam mais mortes acidentais do que queimaduras nos Estados Unidos. As três maiores causas de mortes em queimados são falência cardiorespiratória, infecção não controlada, e o desenvolvimento de síndrome de disfunção orgânica múltipla. Somente pelo melhor entendimento dos

efeitos deletérios das lesões térmicas nas defesas do hospedeiro normal e nos sistemas homeostáticos será possível desenvolver e usar regimes terapêuticos efetivos que melhorem a sobrevivência (2).

Pacientes com SCQ maior que 30% sofrem, invariavelmente, grandes alterações na função cardiovascular resultando em choque. Acredita-se que a fisiopatologia do choque no queimado é um processo complexo resultante de uma disfunção na circulação e microcirculação não revertida apenas pela reposição de volume (3).

Há dois importantes aspectos nas respostas seguidas à lesão térmica. Primeiro, a falta de controle homeostático e segundo, a interação entre a queimadura e o hospedeiro desde os pontos de vista circulatório até metabólico. Na tentativa de descrever a fisiopatologia da queimadura é conveniente associar a pele queimada como um “órgão” especializado com seu próprio suprimento sanguíneo e características metabólicas únicas. A queimadura “comunica-se” com o hospedeiro, e influencia em uma variedade de alterações sistêmicas, circulatórias e metabólicas. As alterações nos queimados são caracterizadas pelos efeitos do calor *per se* e superimpostos por um pronunciado processo inflamatório agudo.

Outro aspecto que deve ser mencionado quando falamos em queimados é a lesão inalatória que ocorre em 10-20% dos queimados que requerem hospitalização sendo responsável por uma mortalidade de 30-90% (4).

Lesão Inalatória

Lesão inalatória é a maior causa de morte em pacientes queimados. A fisiopatologia da lesão inalatória é complexa e não completamente entendida ainda. A inalação de componentes da fumaça parece desencadear a liberação de tromboxane, o qual causa aumento na pressão da artéria pulmonar. Os produtos químicos da fumaça também causam dano direto no epitélio alveolar, levando a atração quimiotática de neutrófilos e subsequente liberação de enzimas proteolíticas. Por fim, lesão traqueobrônquica resulta em descamação da mucosa do trato respiratório e diminuição do mecanismo de depuração mucociliar (5)

Há quatro estágios de lesão pulmonar no curso clínico dos pacientes com lesão inalatória: asfixia e envenenamento agudo, insuficiência respiratória aguda, broncopneumonia e recuperação. No primeiro estágio, há um envenenamento pelo monóxido de carbono, hipóxia e lesão térmica ocasionada diretamente pelo fogo. O segundo estágio ocorre entre 24-48 horas pós injúria e é caracterizado por obstrução aguda da via aérea, traqueobronquite, edema pulmonar e atelectasias devido à lesão da via aérea e/ou epitélio alveolar. Em adição, a lesão pulmonar é aumentada pela liberação de mediadores inflamatórios a partir dos tecidos lesados e células inflamatórias, ambas residentes no epitélio da árvore respiratória. O estágio da broncopneumonia usualmente começa 24h após a injúria e resultante das alterações nos mecanismos de defesa locais e sistêmicos. Muitas mortes relacionadas à inalação ocorrem no segundo e terceiro estágios. Os pacientes que sobrevivem a estas complicações entram no estágio de recuperação.

Os macrófagos alveolares (MA) são os principais fagócitos residentes na superfície pulmonar e servem como mecanismo primário celular de defesa dos pulmões. MA tem um importante papel regulador na resposta imune pulmonar e seu funcionamento eficiente é essencial para controlar as infecções respiratórias.

Macrófagos alveolares são ativados pela inalação da fumaça e recrutam grande número de leucócitos polimorfonucleares para o pulmão. Os MA são a maior fonte de atividade pró-coagulante contribuindo para a trombose microvascular. Além disso, os MA produzem mediadores inflamatórios sistêmicos (ex., IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α). Assim, os MA são envolvidos em toda a cascata do processo que leva à lesão pulmonar induzida pela fumaça até a subsequente cicatrização e recuperação pulmonar (6).

Bidani e colaboradores investigaram os efeitos da inalação de fumaça em modelo com ratos e mostraram uma produção elevada de superóxido em MA expostos à fumaça, e os MA tinham uma secreção reduzida de TNF- α , porém tinha uma maior resposta do TNF- α ao estímulo por lipopolissacarídeos do que os seus controles. Estes resultados são consistentes com o fato de haver uma diminuição da resposta à fagocitose dos macrófagos alveolares durante a lesão inalatória predispondo às infecções (7).

Efeitos locais e sistêmicos da queimadura

O súbito aumento da temperatura na superfície do corpo leva a uma pronta resposta dos vasos sangüíneos na tentativa de dissipar o calor através de uma vasodilatação local. Além disso, o aumento da temperatura nos tecidos inicia uma reação inflamatória, devido à lesão térmica, causando uma liberação de mediadores e reações em cascata se iniciam.

As respostas inflamatórias à injúria, infecção e aos antígenos com uma superprodução de mediadores químicos, uma ativação de células endoteliais e de leucócitos e uma alteração nas citocinas circulantes podem todas contribuir para os efeitos sistêmicos das queimaduras. Assim, em pacientes grandes queimados estes efeitos são: aumentada suscetibilidade às infecções, síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), síndrome do desconforto respiratório do adulto (SDRA) e síndrome da disfunção orgânica múltipla (SDMO), as quais podem desenvolver-se de maneira progressiva com a disfunção de órgãos até a morte.

A queimadura provoca uma resposta envolvendo todas as células do sistema imune, nas quais as citocinas podem agir ou benéficamente fornecendo um aumento na resistência do organismo ou deletoriamente deprimindo a função dos órgãos e causando inflamação sistêmica (Figura 1) (8).

As reações inflamatórias seguidas às queimaduras

Inflamação é uma reação do organismo à injúria tecidual, à invasão por agentes infecciosos ou aos antígenos para fazer com que o sistema imune atue nos locais da injúria ou da infecção. A inflamação é essencialmente uma resposta adaptativa do organismo à agressão, numa tentativa de promover a cicatrização e a cura, aumentando sua capacidade de luta, inclusive contra a infecção. Seguindo-se à agressão, o hospedeiro é exposto a um número de substâncias pró-inflamatórias derivadas tanto de fontes endógenas como exógenas (9).

A seqüência dos eventos que ocorrem durante a resposta inflamatória é a seguinte:

- 1.** Um curto período de vasoconstrição seguido por um período de vasodilatação e hiperemia quando o fluxo sangüíneo as áreas lesadas aumenta. Também dentro de minutos há um aumento da atividade osmótica associada com uma rápida formação de edema.
- 2.** Ativação do sistema da coagulação com deposição de fibrina e acúmulo de plaquetas ativadas na superfície da queimadura. Na matriz de fibrina (um co-polímero de fibrina e fibronectina) restos celulares e de bactérias são presos. As plaquetas ativadas são as primeiras células a liberarem, dentro da queimadura, um grande número de citocinas que ativam macrófagos e fibroblastos.
- 3.** Simultaneamente o complemento é ativado pela via clássica ou pela via alternativa, o que resulta em vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Um grande número de mediadores inflamatórios (histamina, serotonina, cininas, metabólitos do ácido aracdônico e produtos xantina oxidase) tem um importante papel neste processo.
- 4.** Os produtos do complemento ativado (C3a e C5a), o fator plaquetário 4 e vários componentes bacterianos são fatores quimiotáxicos que atraem macrófagos para dentro dos tecidos queimados. Os primeiros leucócitos que chegam dentro da ferida e

que rapidamente fagocitam e matam as bactérias são os leucócitos polimorfonucleares (PMNLs).

5. Os PMNLs são gradualmente substituídos pelos macrófagos que respondem aos mesmos fatores quimiotáticos dos PMNLs. Os macrófagos produzem um grande número de citocinas pela estimulação que são vitais para a cicatrização da queimadura (8). As citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 e o fator estimulador da colônia granulócito-monócito estão entre os primeiros mediadores a serem liberado juntamente com a anafilotoxina C5 um produto da ativação da via alternativa do complemento. Estes mediadores rapidamente disparam uma resposta celular intensa, com liberação de mediadores secundários, quimiotaxia e ativação de granulócitos. Os segundos mediadores são responsáveis tanto pela reativação das células fagocíticas como da cascata inflamatória disseminando esta resposta. Por outro lado, as citocinas antiinflamatórias modulam a resposta inflamatória e pode auxiliar no reparo tecidual. Estes mediadores antiinflamatórios incluem o fator transformador do crescimento β , IL-4, IL-10 e o antagonista do receptor da IL-1 (rIL-1) (8).

É possível especular que o balanço entre as citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias seja um fator determinante da evolução ou não para disfunção orgânica múltipla, choque e óbito. A interação entre os mediadores da resposta inflamatória e antiinflamatória pode ser vista como uma batalha entre forças opostas, sendo que nas queimaduras há um predomínio da resposta inflamatória (10). Em resumo, como alguns desses mediadores podem afetar sua própria liberação e a de outros mediadores, a síndrome da resposta inflamatória sistêmica é capaz de sustentar sua própria existência. Este é um dos motivos pelos quais as tentativas de cura das queimaduras através da eliminação dos patógenos infectantes, desbridamento e enxertia precoce das queimaduras têm sido falha, pois é incapaz de interferir com a cascata da liberação da mediadores (11) (Figura 2).

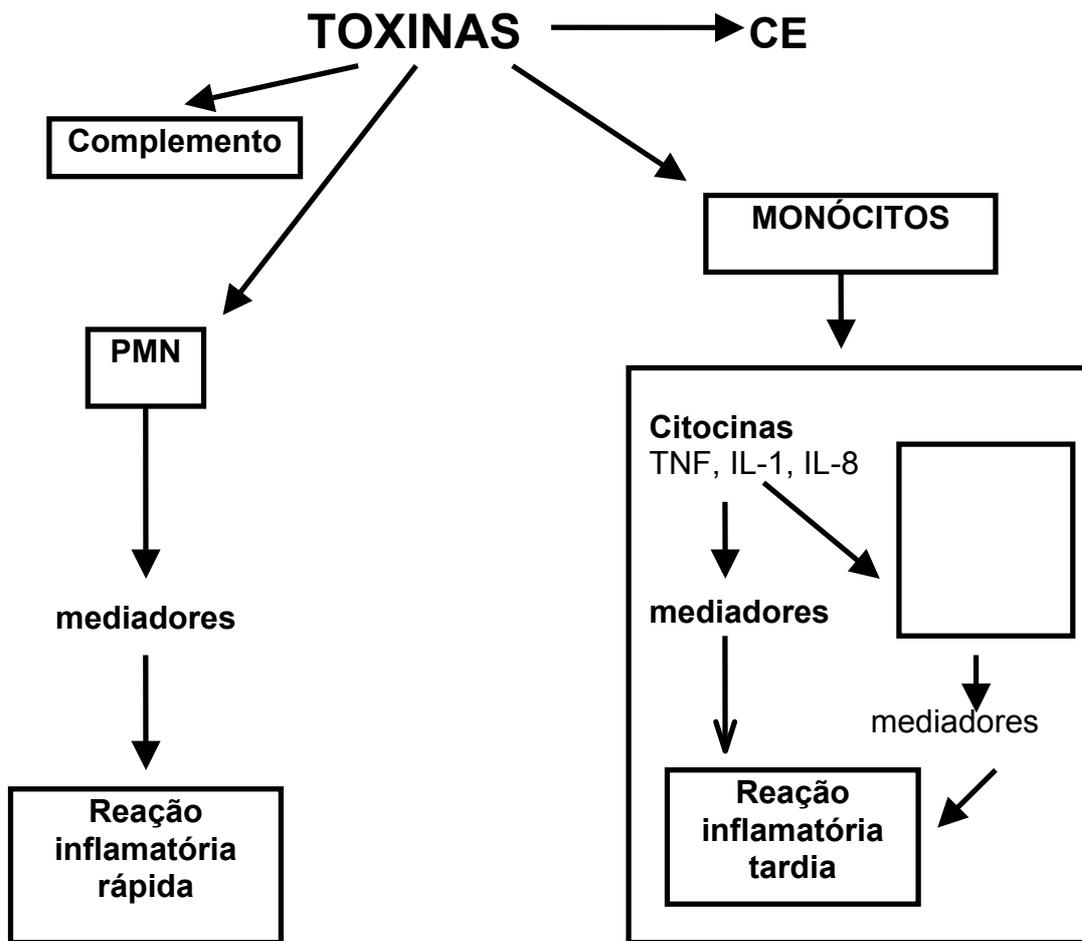


Figura 2. Ativação direta e indireta da cascata inflamatória

Abreviaturas: CE- célula endotelial; PMN-polimorfonuclear; TNF-fator de necrose tumoral; IL-1 -interleucina 1; IL-8 -interleucina 8.

Produtos biológicos - citocinas

As citocinas são moléculas bioativas que mediam a resposta do hospedeiro ao estímulo inflamatório ou ao trauma e podem ser vistas como um meio de comunicação entre os leucócitos e as células endoteliais e também, entre as outras células. As citocinas são pequenas proteínas com atividade autócrina, parácrina e endócrina. Numerosos processos moleculares são necessários para que as citocinas exerçam seus efeitos. Inicialmente as células inflamatórias recebem estímulos de natureza diversa, detectado através dos receptores da superfície celular. A informação detectada na superfície celular é transduzida intracelularmente, e o mecanismo de produção do RNA mensageiro e a síntese proteica são iniciados. Quando as citocinas são secretadas, elas ligam-se a receptores específicos no tecido-alvo, e estes receptores elaboram sinais que alteram o fenótipo e as respostas das células-alvo. Cada um desses passos é fortemente controlado e pode servir como alvo de manipulação terapêutica (12).

As citocinas exercem seus efeitos em baixas concentrações moleculares por interações altamente específicas com os receptores de superfícies celulares. As respostas específicas das células às citocinas são determinadas em parte pelo reservatório de receptores expressos naquelas células. Estes receptores são dependentes do tipo de célula alvo e seu estágio de diferenciação e ativação. O nível de expressão de superfície dos receptores das citocinas é determinado pela taxa de inserção de receptores dentro da membrana plasmática (por síntese ou reciclagem) e pela perda de receptores (por difusão ou internalização) (13).

As citocinas mais bem estudadas durante a endotoxemia e também as queimaduras são as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e a IL-1. Além destes, outros mediadores pró-inflamatórios são sintetizados e secretados como a IL-6, a IL-8 e o fator ativador plaquetário. Também os fatores antiinflamatórios IL-10, catecolaminas e glicocorticóides são secretados, assim como os receptores solúveis do TNF- α .

(sTNFR) e da IL-1 (IL-1RA). Embora estes agentes não sejam intrinsecamente antiinflamatórios, eles podem modular as atividades biológicas das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1. Em pacientes queimados e outras desordens inflamatórias agudas, o resultado final da biossíntese de citocinas está inadequadamente controlado e pode ter conseqüências mórbidas como disfunção de múltiplos órgãos (14).

A expressão de alguns receptores parece ser constitutiva e a expressão de outros receptores de citocinas pode ser regulada para cima ou para baixo após a exposição a ligandos específicos, ou pela ativação de vias de sinalização intracelular por outras citocinas. Particularmente, o papel e o significado dos receptores solúveis ainda não está completamente definido (Figura 3).

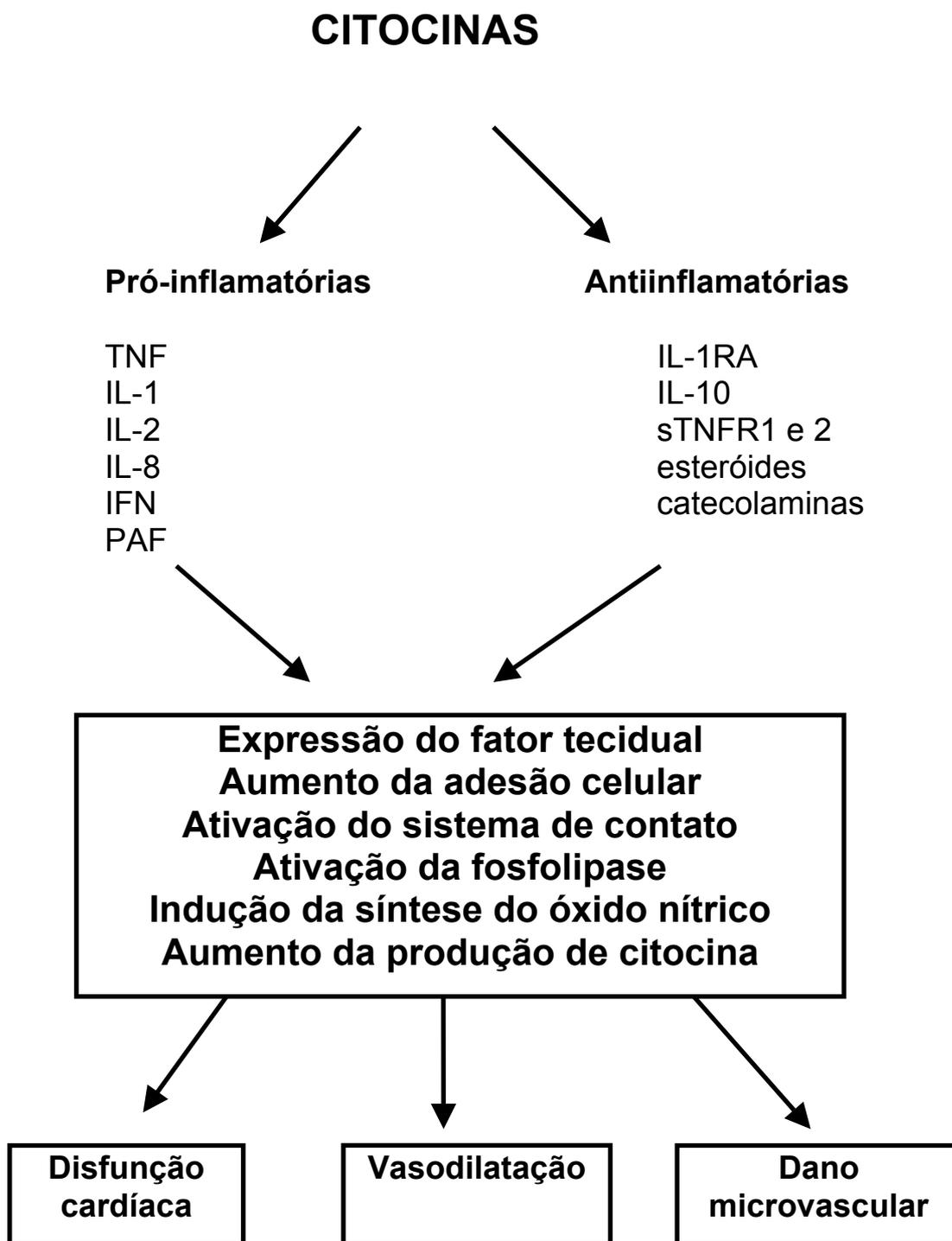


Figura 3. Balanço inflamatório.

Abreviaturas: TNF- fator de necrose tumoral; IL-1 -interleucina 1; IL-2 -interleucina 2; IL-8 -interleucina8; IL-10-interleucina 10; IL-1RA-receptor da interleucina 1; IFN- interferon.

Interleucina-1 (IL-1)

É uma citocina pró-inflamatória que tem dois polipetídeos IL-1 α e IL-1 β que induz a uma variedade de reações da fase aguda. A IL-1 também estimula a função dos neutrófilos, regula a produção de muitas outras citocinas e induz a febre. O receptor antagonista da IL-1 (IL-1RA) inibe a resposta inflamatória induzida pela IL-1 e a proliferação de células-T. IL-1RA é a maior proteína intracelular nos ceratinócitos e pode ser liberado a partir de células mortas na epiderme. Após uma grave queimadura tem sido demonstrado nível circulante de IL-1 bem como IL-1RA. As concentrações foram mais elevadas na admissão e diminuídas no período da alta (15).

Interleucina-6 (IL-6)

É produzida pelos linfócitos, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais. No fígado estimula a produção de proteínas da fase aguda. Induz a diferenciação de células-B a formarem anticorpos. Nível aumentado tem sido observado em pacientes queimados especialmente na sepse letal após queimadura (16). Tem sido postulados que IL-6 suprime a IL-1 e o TNF.

Interleucina-8 (IL-8)

É uma citocina pró-inflamatória com atividade quimiotática. É produzida pelos monócitos, células endoteliais, ceratinócitos e neutrófilos. Um nível aumentado de IL-8 tem sido demonstrado em pacientes queimados. A média da concentração plasmática de IL-8 em pacientes queimados foi cerca de 60 vezes maior do que em controles saudáveis. As grandes concentrações de IL-8 circulantes após grandes queimaduras podem ser responsáveis pela forte e sustentada ativação dos neutrófilos (17).

Fator de Necrose Tumoral- α

As células derivadas da linhagem dos monócitos e macrófagos ativadas são as principais fontes de TNF- α , mas este pode também ser produzido por células gliais, mastócitos, pelas células de transcrição nuclear (NK cells), células linfocíticas B e T e ceratinócitos da pele. Por outro lado fatores endógenos e exógenos produzidos por bactérias, vírus, parasitas e tumores são capazes de induzir as células a produzirem TNF- α . Transitoriamente há níveis aumentados de TNF- α em pacientes queimados e há uma associação com um pobre prognóstico (18).

O TNF é liberado sistemicamente quase que imediatamente após qualquer insulto, modificando as propriedades das células endoteliais, ativando neutrófilos e induzindo a liberação de outras citocinas. A combinação destes efeitos culmina com o colapso cardiovascular.

O TNF pertence a uma família de ligandos que ativam os receptores estruturalmente relacionados. Estes sinais são referidos para o desenvolvimento normal e função do sistema imune. Mutações dos genes correspondentes aos ligandos e receptores podem causar distúrbios dos linfócitos, desarranjo do sistema imune ou doença auto-imune (18).

o TNF- α exerce muitos efeitos diretos ou indiretos, por exemplo, sobre as células endoteliais, e estes efeitos podem modificar vários sistemas:

1. Coagulação: o TNF- α induz a atividade pró-coagulante das células endoteliais através da liberação do PAF e o fator de von Willebrand favorecendo a trombose. Ao mesmo tempo, regula para baixo a expressão da trombomodulina que bloqueia a interação dos complexos de proteína C/proteína S, diminuindo as propriedades anticoagulantes da superfície das células endoteliais. Controla também a fibrinólise, pela via de modulação dos ativadores-inibidores do plasminogênio e ativador do plasminogênio tecidual.

Supõe-se que estes efeitos pró-coagulantes sirvam para isolar o local de infecção do sistema circulatório (19).

2. Adesão celular: o TNF- α regula para cima todas as moléculas de adesão celular ou expressa *de novo* na superfície das células endoteliais. Entre as moléculas de adesão, a molécula de adesão intracelular (ICAM)-1 media a adesão de vários leucócitos. Outros elementos sangüíneos, tais como as plaquetas via ICAM-1 impedem o fluxo sangüíneo promovendo a coagulação. Também o TNF- α pode modificar a forma e/ou afinidade das moléculas de superfície celulares ou, em outros casos reduzir a expressão das moléculas de adesão (20).

3. Quimiotaxia/Transmigração:*In vivo*, o TNF- α causa marginação dos neutrófilos, e durante a inflamação, a adesão é acompanhada de migração celular transendotelial, podendo haver desequilíbrio entre estes dois fenômenos. Pode haver apenas o fenômeno de adesão, durante a inflamação, levando ao seqüestro intravascular. Alternativamente, também pode ocorrer apenas o fenômeno de migração, sem moléculas de adesão presentes (18).

4. Outros efeitos na vasculatura: o TNF- α aciona liberação de prostaglandina E₂, prostaciclina I₂, tromboxane A₂ e óxido nítrico (o qual exerce efeito vasodilatador) e endotelina (potente vasoconstritor) das células endoteliais. Estes mediadores podem exercer efeitos conflitantes e, a principal influência do TNF- α dependerá da localização onde é produzido e o leito vascular com o qual ele interage (19).

Receptores do TNF- α

O TNF- α liberado dentro da circulação após endotoxemia ou injúria externa parece ocorrer em um padrão estereotipado. Após endotoxina endovenosa há um pico

de TNF- α em torno de 90 a 120 minutos, o qual desaparece em aproximadamente 4 a 6 horas. O TNF- α desaparece do soro em dois espaços funcionais: a) ligando-se a receptores do TNF- α e às proteínas solúveis ligadas ao TNF- α e b) pela depuração da proteína pelos rins e fígado (18).

Acredita-se que toda a família de receptores do TNF- α seja de proteínas transmembrana que consistem de duas subunidades idênticas. A família é definida por um aminoácido rico em cisteína que se repete de três a seis vezes na região extracelular. Tem sido descrito até o momento que o TNF possui dois receptores com afinidade similar: o receptor 55kd (sTNFR1) e o receptor 75kd (sTNFR2) (21). Os dois receptores estão presentes em virtualmente todos os tipos de células, exceto as hemáceas. A região extracelular do receptor é que define como parte da família, mas as estruturas intracitoplasmáticas não são homólogas, sugerindo que os dois receptores utilizem vias separadas para a transdução intracelular. As vias que são ativadas pelo sTNFR2 (75kd) são desconhecidas, mas os sistemas de segundo mensageiro incluem a proteinocinase C, fosfolipase A2, esfingomielinase e fosfolipase fosfatidilcolina-específica. O complexo ligando-receptor TNF é internalizado e metabolizado, mas como isso ocorre e como é expressa sua bioatividade é incerta, uma vez que esta pode ser expressa na ausência de internalização ou por ligação com anticorpos anti-receptores (18).

As interações entre o TNF- α e seus receptores são presumivelmente interações típicas entre pares de receptor-ligando nestas duas famílias moleculares. Os ligandos triméricos da família TNF podem causar agregação das sub-unidades dos receptores, dessa maneira disparando uma resposta celular, já que os anticorpos contra os dois receptores do TNF- α mimetizam ações do TNF- α . No entanto, não está determinado, como se processa a informação entre receptor e ligando, havendo várias hipóteses (21).

Os receptores solúveis das citocinas competem com receptores ligados à membrana regulando a sinalização das citocinas. Tais receptores solúveis podem ser receptores ligados à membrana, os quais são desprendidos intactos na circulação, ou como formas truncadas (por exemplo os receptores solúveis do TNF: sTNFR), ou ainda como moléculas precursoras que são clivadas enzimaticamente (por ex.: IL-1R). Os receptores solúveis podem aparecer em resposta a um estímulo, como parte de um processo regulador independente, que ocorre naturalmente para limitar os efeitos deletérios dos mediadores (por ex.: sTNFR). Alguns receptor solúvel tem pouca atividade de ligação, representando perdas superficiais pouco relevantes dos receptores celulares (ex. forma solúvel da IL-2R α) (22).

Em resumo, numerosos estímulos incluindo febre, endotoxemia, o próprio TNF- α , como também outras citocinas, induzem a liberação de grandes quantidades de produtos dos receptores do TNF- α degradados por clivagem proteolítica dentro da circulação. A função destes peptídeos chamada de proteínas ligadas ao TNF- α , ou receptores solúveis é incerta, mas parecem mediar a atividade biológica, controlando a dessensibilização aos ligandos, diminuindo a disponibilidade, diminuindo a sinalização e estimulando os mecanismos celulares que podem resultar, até mesmo, em falta de atividade e, parecem depender da quantidade presente na circulação. Baixos níveis dos receptores solúveis estão ligados à estabilização servindo como uma reserva disponível para a liberação gradual. Altos níveis de receptores solúveis antagonizam os efeitos do TNF- α sinalizando citotoxicidade e outras respostas imunológicas (12).

Com relação ao papel do TNF- α e seus receptores em pacientes queimados ou com sepse ainda não há um consenso, havendo necessidade de estudos mais detalhados para definir sua importância como indicador prognóstico.

Endotelina

Entre suas múltiplas funções biológicas, o endotélio sintetiza substâncias vasoconstritoras, conhecidas como fatores de contração do endotélio (EDCFs), que incluem as endotelinas, os fatores produzidos pela via da ciclooxigenase (tromboxano A₂, prostaglandinas H₂ e anions superóxidos) e possivelmente a angiotensina II.

As endotelinas são peptídeos de 21 aminoácidos podendo ser produzidos por uma grande variedade de células vasculares e não vasculares, estando presentes no cérebro, rins, intestinos, pulmões e adrenais. No homem existem três isoformas de endotelina: ET-1, ET-2 e ET-3. A ET-1 é o único membro da família produzida por células endoteliais, porém também é produzida pelas células musculares lisas vasculares, neurônios e astrócitos, células endometriais, hepatócitos, células mesangiais do rim, células de Sartori e células epiteliais da mama. A ET-1 é considerada o mais importante vasoconstritor conhecido, além de exercer muitos outros efeitos biológicos (23).

As células endoteliais sintetizam um precursor, a pré-pró-endotelina, que sofre clivagem proteolítica (endopeptidase) gerando uma forma intermediária inativa (pré-endotelina ou "big" -endotelina). Subseqüentemente, é gerado o peptídeo ativo da endotelina. Esta forma ativa atua, então, em receptores específicos das células musculares lisas e ativa canais de cálcio dependente de voltagem. Os efeitos biológicos da endotelina são mediados pelos receptores específicos ET-A, ET-B e ET-C. Os receptores ET-A encontram-se predominantemente nas células musculares lisas e ligam-se preferencialmente à ET-1 sendo responsáveis pela vasoconstrição. Os receptores ETB também estão presentes nas células musculares lisas, contribuindo para a vasoconstrição particularmente em baixas concentrações de endotelina. Diferentemente dos receptores ETA, os receptores ETB podem ser utilizados por todas as três formas de endotelinas. A ativação destes receptores induz a liberação de óxido nítrico e prostacilina, e explica a vasodilatação transitória causada pela aplicação intraluminal de endotelina. Ambos receptores expressam-se em outros

tecidos, incluindo pulmão, coração, rim, cérebro e supra-renais. O terceiro receptor (ETC), mais específico para ET3 ainda não foi identificado (23, 24).

Vários fatores são capazes de estimular a liberação de ET-1, e incluem: o estresse da bainha da parede do vaso, hipóxia, endotoxina, TNF- α , interferon, adrenalina, angiotensina, trombina, plaquetas ativadas e alguns prostanóides. A liberação local de ET-1 deve ser esperada durante qualquer resposta inflamatória (25). Isto sugere que ET-1 seja liberada para contrabalançar os efeitos vasodilatadores e modular o tônus vascular. Em contraste, os vasodilatadores como óxido nítrico e prostaciclina inibem a produção de ET-1, através de um mecanismo comum envolvendo a produção de 3-5-monofosfato de guanosina. A ET-1 pode estimular a produção do hormônio natriurético atrial cardíaco, talvez como mecanismo compensatório de oposição à ação vasoconstritora da ET-1, fazendo com que haja maior retenção de líquido e adequando a pré-carga em uma fase inicial. No entanto, o hormônio natriurético atrial aumentado também inibe a produção basal de ET-1, uma vez que os efeitos da ativação crônica da endotelina se tornam excessivos e contribuem para a deterioração da função cardíaca (23).

As endotelinas exercem grandes variedades de efeitos biológicos em diferentes tecidos: 1) efeitos hemodinâmicos: vasodilatação e hipotensão inicial seguida de vasoconstrição potente e efeito vasopressor sustentado, inotropismo e cronotropismo miocárdicos positivos, vasoconstrição das artérias coronárias; 2) efeitos renais: aumento da resistência vascular renal, redução do fluxo plasmático renal, aumento da absorção de sódio devido a efeitos hemodinâmicos; 3) efeitos neuroendócrinos: aumento dos níveis plasmáticos de catecolaminas, renina, aldosterona e fator natriurético atrial, modulação da transmissão sináptica; 4) efeitos nas células musculares lisas: causando contração das células musculares lisas vasculares, sendo a contração das veias mais acentuada que a das artérias e contração da musculatura lisa não vascular; e 5) efeitos pró-mitogênicos e na transcrição de genes.

Normalmente os níveis circulantes de endotelina, bem como a produção de peptídeos em vasos sanguíneos isolados é relativamente baixa, sugerindo que em condições fisiológicas pouca endotelina seja produzida devido à ausência de estímulo e/ou a presença de mecanismos inibitórios potentes. Sabe-se, também, que a maior parte da endotelina produzida é liberada diretamente nas células musculares lisas e não da luz dos vasos, atuando mais como agente parácrino (local) do que como hormônio endócrino (circulante). Entretanto a importância da endotelina circulante não pode ser descartada e sugere que a endotelina tenha outras funções além do controle vasomotor (24).

A despeito dos potenciais efeitos diretos ou indiretos no tônus vasomotor há um inequívoco aumento da produção e liberação da ET-1 na sepse, mas seu papel permanece pouco esclarecido. Em um estudo realizado em pacientes queimados, demonstrou-se concentrações mais elevadas de ET-1 em pacientes que desenvolveram sepse quando comparados com os que não desenvolveram e em pacientes não sobreviventes quando comparados aos sobreviventes, mostrando que níveis aumentados de ET-1 estão intimamente relacionados com mau prognóstico nesse grupo de pacientes (26).

Em suma, o envolvimento de múltiplos mediadores biológicos na patogênese da evolução em grandes queimados, faz supor que os mesmos desempenhem papel semelhante àquele descrito em sepse grave, onde níveis elevados destes indicam pior prognóstico. No entanto, a avaliação precoce e seriada, no contexto de pacientes grandes queimados, do TNF- α , dos receptores solúveis do TNF- α e da ET-1 permanece pouco estudado.

HIPÓTESE

Nos pacientes grandes queimados os níveis plasmáticos de TNF- α , de seus receptores solúveis (sTNFR1 e sTNFR2) e da ET-1 se elevam precocemente após o insulto associando-se a uma maior mortalidade.

OBJETIVOS

Principal

Determinar o valor preditivo para mortalidade dos níveis plasmáticos precoces de citocinas e ET-1 em pacientes grandes queimados.

Secundários

Determinar a associação dos níveis plasmáticos dos mediadores inflamatórios com o escore APACHE II, com a superfície corporal queimada (SCQ) e com a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (SDMO).

Bibliografia

(revisão da literatura)

1. Reports on the Epidemiological and Surveillance of Injuries. U.S. Dept. of Health, Education. Atlanta, Center for Disease Control, 1999.
2. Edwin A Dietch. Burn Management In: James Rippe, Richard Irwin, Mitchel Fink, Frank Cerra, editors. Intensive Care Medicine. Third Edition. New York: Little, Brown and Company.1996. P.1957-1965.
3. Basil Pruitt and Arthur Mason. Epidemiological, Demographic and Outcome Characteristics of Burn Injury. D. Herndon, editor- Total Burn Care- Saunders Company.1996. p. 5-15.
4. Guy JS and Peck MD. Smoke inhalation Injury: Pulmonary implications. Resp Care Journ. 1999;44: 388-402
5. Nguyen T, Gilpin D, Meyer N, HerndonD. Current treatment of severely burned patients. Ann Surg. 1996; 233: 14-25.
6. Rose K and Herndon D. Advances in the treatment of burns patients. Burns. 1997;23: Suppl:S19-S26.
7. Bidani A, Wang C and Heming T. Early effects of smoke inalation on alveolar macrofage functions. Burns. 1996; 22:101-106.
8. Artunson G. Pathophysiology of the burn wound and pharmacological treatment. The Rudi Hermans Lecture,1995. Burns. 1996; 22: 225-274.
9. Williams J. Maier R: The inflammatory response. Journ Inten Care. 1992;7: 53-66.
10. Bone R: Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS and Cars. Crit Care Med. 1996; 24: 1125-1128.
11. Bone R: The systemic inflammatory response syndrome (SIRS). Update in Intensive Care Emergency Medicine. 1995 ;19: 3-12.

12. Williams G, Giroir B: Regulation of cytokine gene expression: tumor necrosis factor, interleukin-1, and the emerging biology of cytokine receptors. *New Horizons*. 1995;3:276-287.
13. Arai K, Lee F, Miyajima A: Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann Rev Biochemistry*. 1990;59: 783-836.
14. Hauser C: Regional macrophage activation after injury and the compartmentalization of inflammation in trauma. *New Horizons*. 1996; 4: 235-251.
15. Joseph G. Cannon, Friedberg J, Gelfand J, Tompkins R, Dinarello C. Circulating interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α concentrations after burn injury in humans. *Crit Care Med*. 1992; 20: 1414-1419.
16. Drost A, Burlenson D, Cioffi W, Jordan B, Mason A, Pruitt B. Plasma cytokines following thermal injury and their relationship with patient mortality, burn size, and time postburn. *J Trauma*. 1993; 35: 335-339.
17. Vindenes H, Ulvestad E, and Bjerknes R. Increased levels of circulating interleukin-8 in patients with large burns: Relation to burn size and sepsis. *J Trauma*. 1995; 39: 635-640.
18. Tracey K., Cerami A: Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. *Crit Care Med*. 1993; 21: Suppl: S415-S422.
19. Beutler B, Grau G: Tumor necrosis factor in pathogenesis of infectious diseases. *Crit Care Med*. 1993; 21: Suppl: S423-S435.
20. Livingston D, Mosenthal A, Deitch E: Sepsis and multiple organ dysfunction syndrome: a clinical mechanistic overview. *New Horizons*. 1995;3:257-266.
21. Bazzoni F, Beutler B: The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*. 1996; 334: 1717-1725.
22. Galley H, Webster N: The Immuno-inflammatory cascade. *Brit J Anaest*. 1996; 77: 11-16.

23. Levin R: Endothelins. *N Engl J Med.* 1995; 333: 356-363.
24. Batlouni M: Endotelinas e outros fatores vasoconstritores derivados do endotélio. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo.* 1996; 6: 138-15.
25. Curzen N, Jourdan K, Mitchell J: Endothelial modification of pulmonar vascular tone. *Intensive Care Med.* 1996; 22: 596-607.
26. Nakae H, Endo S, Inada K, Yamada Y, Takakuwa T, Yoshida M. Plasma levels of endothelin-1 and thrombomodulin in burn patients. *Burns.* 1996; 22: 594-597.

Dosagem seqüencial de fator de necrose tumoral- α , seus receptores solúveis e endotelina-1 como valor preditivo de mortalidade no grande queimado

**Cyntia Aguiar Ribeiro, Lissandro Tarso, René Busnello,
Cristiane Andrade, Nadine Clausell**

Unidade de Tratamento Intensivo de Queimados do Hospital Municipal de Pronto Socorro de Porto Alegre e Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Endereço para correspondência:

Dra. Nadine Clausell
Serviço de Cardiologia
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350 sala 2060
Porto Alegre, RS - Brasil - 900035-003
Fone: 51 316 8344; FAX 55 342 4834
e-mail: clausell@portoweb.com.br

RESUMO

INTRODUÇÃO: Queimaduras estão associadas a uma intensa atividade imunoinflamatória; contudo, um perfil seqüencial precoce dos níveis de TNF- α , seus receptores solúveis e endotelina (ET)-1 (um potente vasoconstritor) em pacientes queimados ainda não está claro.

MÉTODOS: Foram estudados vinte pacientes com uma superfície corporal queimada (SCQ) $\geq 30\%$ e com menos de 6h desde o acidente. Amostras de sangue foram retiradas no momento zero, 6, 12, 24h para seqüencialmente medir os níveis do TNF- α , seus receptores solúveis 1 e 2 (sTNFR1 e sTNFR2) e ET-1 usando ensaios ELISA.

RESULTADOS: Idade, SCQ e lesão inalatória não foram significativamente diferentes entre sobreviventes (n=10; 30 \pm 13 anos, SCQ 40 \pm 12%) e não sobreviventes (n=11; 38 \pm 15 anos, SCQ 56 \pm 20%). Níveis do sTNFR1 estavam aumentados em não sobreviventes (2937 \pm 1676 pg/ml; 4548 \pm 1436 pg/ml) comparado aos sobreviventes (1313 \pm 561 pg/ml; 2561 \pm 804 pg/ml) nas 6 e 24h, respectivamente (P=0,01 e 0,002), enquanto níveis de sTNFR2 estavam significativamente aumentados em não sobreviventes (4617 \pm 1876 pg/ml vs 2611 \pm 1325 pg/ml) somente nas 6h (P=0,015). Níveis elevados de sTNFR1 nas 6h e TNF- α nas 12h mostraram valor preditivo positivo de 100% (para ambos marcadores) e valor preditivo negativo para mortalidade de 70 e 52%, respectivamente; risco relativo de 3,25 e 1.2, respectivamente; com intervalos de confiança de 1,4-7,3 e 1,28-3,52, respectivamente.

CONCLUSÕES: Níveis aumentados de sTNFR1 e sTNFR2 foram maiores nas 6h em pacientes queimados não sobreviventes. Níveis de TNF- α e ET-1 foram

similares em não sobreviventes e sobreviventes. Determinação muito precoce de sTNFR1 e sTNFR2 poderiam ajudar a identificar o risco de prognóstico adverso em pacientes grandes queimados.

INTRODUÇÃO

Grandes queimaduras são lesões relativamente comuns que requerem tratamento multidisciplinar visando reduzir morbidade e prevenir mortalidade. Em pacientes com grandes áreas queimadas, com uma superfície corporal queimada (SCQ) maior do que 30%, podem ocorrer marcadas alterações cardiovasculares levando ao choque circulatório. Acredita-se que este é um processo complexo envolvendo uma disfunção na microcirculação onde a simples reposição de volume pode não ser suficiente para controlar a deterioração do paciente (1, 2). Além disso, quando ocorre à lesão inalatória, usualmente em 10-20% dos pacientes queimados, a mortalidade pode variar desde 30 até 90% (3). Parece que nesta situação, a reação inflamatória é mais proeminente, o desequilíbrio na distribuição do fluxo sangüíneo é mais grave, o risco de infecções está aumentado e há também um aumento no risco de disfunção de múltiplos órgãos (SDMO) (4).

Mediadores inflamatórios, chamados citocinas, sabidamente estão envolvidos na patogênese da disfunção orgânica em pacientes gravemente enfermos. As citocinas podem ter papéis múltiplos contribuindo para a instabilidade hemodinâmica. Mais especificamente, nós demonstramos recentemente que níveis aumentados de fator de necrose tumoral (TNF)- α quando detectados num momento precoce após o diagnóstico de choque séptico, estão associados a uma mortalidade elevada (5). O TNF- α tem a sua atividade biológica modulada por dois tipos de receptores celulares com peso molecular de 55 e 75kD, sTNFR1 e sTNFR2, respectivamente. Na sepse, parece que a detecção desses receptores solúveis na circulação também seriam indicativos de um pior prognóstico (6). Tem sido sugerido que os efeitos cardiodepressores do TNF- α contribuam para um prognóstico sombrio em pacientes com choque séptico (7). Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse no

estudo das citocinas em pacientes queimados, bem como alguns relatos indicando que estes mediadores estão aumentados nesta situação. De fato, níveis aumentados de TNF- α e receptores solúveis do TNF- α tem sido demonstrados em pacientes queimados, porém a sua associação com prognóstico permanece controversa (8, 9, 10).

Além dos mediadores inflamatórios, sabe-se que outros marcadores biológicos também têm um importante papel em pacientes gravemente enfermos (11). As endotelinas são agentes vasoconstritores potentes as quais estão também elevadas na sepse e parecem estar associadas com mortalidade (5). Similarmente aos estudos envolvendo o TNF- α , a endotelina (ET)-1 mostrou-se aumentada em pacientes queimados (12, 13), porém a descrição precisa de um perfil temporal precoce do comportamento da ET-1 inexistente nesta situação. Adicionalmente, não está claramente estabelecido se níveis de ET-1 estão relacionados à morbidade e mortalidade em pacientes queimados (12, 13).

Como uma rápida deterioração clínica com uma alta taxa de mortalidade são temidas em pacientes queimados, a identificação de marcadores precoces de prognóstico reservado pode ajudar a guiar medidas terapêuticas diferenciadas que possam trazer benefícios no manejo clínico desses pacientes. Neste estudo, nós procuramos investigar o perfil seqüencial e precoce de níveis circulantes de TNF- α , seus receptores solúveis e ET-1 em pacientes queimados com SCQ \geq 30%, sendo que a primeira amostra de sangue foi coletada dentro de 6 horas após o acidente e de maneira seriada a cada 6h nas primeiras 24h.

MATERIAL E MÉTODOS

População em estudo

Este estudo foi conduzido após o termo de consentimento informado ser obtido de cada paciente ou seu familiar, e o protocolo ter sido aprovado pelos comitês de ética e pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Hospital de Pronto Socorro de Porto Alegre.

Pacientes adultos admitidos na unidade de tratamento intensivo (UTI) de Queimados do Hospital de Pronto Socorro de Porto Alegre, com diagnóstico de queimadura por chama ou escaldamento com SCQ de 30% ou mais e com até 6 horas de queimadura, foram incluídos consecutivamente neste estudo. Critérios de exclusão foram: queimaduras elétricas, menores de 16 anos, gravidez, insuficiência cardíaca descompensada, uremia, neoplasia, doenças auto imune, eventos cardiovasculares recentes e uso de corticosteróides. Escore APACHE foi obtido de todos os pacientes dentro das 24h da admissão na UTI (14). Todos os pacientes internados foram ressuscitados de acordo com a fórmula de Parkland (4ml de Ringer Lactato x SCQ x peso - volume em 24 horas) modificada para manter um débito urinário maior que 50ml/hora, além de nutrição, antibioticoterapia e cirurgia conforme tratamento padrão da cirurgia plástica da unidade de queimados. Não houve interferência dos pesquisadores no manejo dos pacientes. Os pacientes foram acompanhados até a alta hospitalar ou óbito.

Coleta das amostras de sangue

Imediatamente após a chegada na UTI, os pacientes tiveram 20 ml de sangue retirados desde de um sítio venoso previamente puncionado para quatro tubos contendo EDTA no momento zero (chegada) e nas 6, 12, 24 horas subsequentes. As amostras foram imediatamente centrifugadas a 3000 rpm durante 20 minutos e o

plasma foi então estocado a -70° para posterior análise cega. Ensaio ELISA foram feitos em duplicata para cada amostra para minimizar a variabilidade intra-ensaios.

Enquanto o TNF- α e seus receptores foram analisados diretamente do plasma, ET-1 foi inicialmente extraída do plasma usando-se solvente para extração (acetona: 1N HCl:H₂O (40:1:5)). Conjuntos disponíveis comercialmente de ensaios ELISA foram usados para medidas de TNF- α , sTNFR1, sTNFR2, e ET-1; os limites inferiores para detecção nos ensaios foram 1,6 pg/ml, 7,8 pg/ml, 7,8pg /ml e 4,4 pg/ml, respectivamente (R&D Systems, Minneapolis, MA.). Os valores médios encontrados no plasma de controles normais, fornecidos pelos ensaios são abaixo de 15,6 pg/ml para o TNF- α , 914 pg/ml (484-1407) para o sTNFR1, 1500 pg/ml (829-2262) para os TNFR2 e de 0,6 pg/ml (0,3-0,9) para a ET-1.

Análise Estatística

Os resultados são apresentados em média e \pm desvio padrão (DP) para variáveis com distribuição normal. Para aquelas com distribuição não paramétrica, mediana (variação máxima e mínima) são apresentadas. Comparações entre sobreviventes e não sobreviventes foram feitas usando o teste de Mann-Whitney ou teste *t* de Student conforme apropriado seguido de correção de Bonferroni. Foi feito teste do χ^2 para comparar variáveis categóricas. Teste de Coeficiente de Correlação de Pearson foi usado para estudar associação entre níveis plasmáticos dos marcadores biológicos e outras variáveis. Risco relativo foi calculado usando valores da média ou da mediana da distribuição dos níveis plasmáticos dos marcadores para estabelecer pontos de corte. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$.

RESULTADOS

Características clínicas dos pacientes

Vinte pacientes constituíram a população em estudo: nove formaram o grupo dos sobreviventes e 11 foram não sobreviventes. A média de idade foi de 30 ± 13 anos nos sobreviventes e de 38 ± 15 anos nos não sobreviventes, porém sem diferença estatística. Não foi demonstrada diferença entre o momento do acidente e da primeira coleta de sangue para dosagem dos mediadores entre os dois grupos, sendo a média de 3,8h para os não sobreviventes e 3,7h para os sobreviventes. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre a SCQ nos dois grupos, ou seja $40 \pm 12\%$ para sobreviventes e $56 \pm 20\%$ para não sobreviventes ($P=0,058$). Como esperado, o escore de APACHE II e a SDMO foi significativamente maior em não sobreviventes ($15,6 \pm 6,2$ e $2,6 \pm 1,6$) comparado aos sobreviventes ($9,8 \pm 5,2$ e $0,44 \pm 0,7$), ($P=0,048$ e $P=0,002$, respectivamente). Finalmente, não houve diferença nos dois grupos na incidência de lesão inalatória e óbito ($P=0,15$). A média de lesão inalatória em todo o grupo foi de 60 %, com uma mortalidade geral de 55%. As características clínicas dos pacientes são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Características clínicas de sobreviventes e não sobreviventes

Paciente #	Sexo	Idade (anos)	APACHE II	SCQ (%)	SDMO	Inalação	Sobrevida (dias)
Sobreviventes							
1	M	25	7	30	0	N	alta
2	M	34	13	30	2	S	alta
3	M	59	17	38	0	N	alta
4	M	32	14	42	1	S	alta
5	M	17	16	65	0	N	alta
6	M	31	8	40	1	S	alta
7	M	18	4	30	0	N	alta
8	M	37	3	54	0	N	alta
9	M	19	7	35	0	N	alta
média ± DP		30 ± 13	9,8 ± 5,2 *	40 ± 12	0,4 ± 0,7 *		
Não sobreviventes							
1	M	25	8	52	0	N	3
2	M	47	14	84	2	S	12
3	F	32	28	52	5	S	2
4	F	42	7	31	2	S	44
5	M	24	20	100	4	S	2
6	M	54	13	40	3	S	4
7	M	56	23	44	3	S	3
8	M	20	14	62	5	S	14
9	M	31	12	62	0	S	5
10	M	26	18	42	3	S	5
11	M	65	13	47	2	N	57
média ± DP		38 ± 15	15,4 ± 6,2 *	56 ± 20	2,6 ± 1,6 *		13,7 ± 18,8

M= Masculino; F= Feminino; SDMO= Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos; APACHE II

Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score; * P< 0,05 para sobreviventes e não sobreviventes

Níveis plasmáticos de fator de necrose tumoral - α

Os níveis plasmáticos de TNF- α foram similares em todos os momentos nos dois grupos porém mais elevados do que valores controles. Especificamente, sobreviventes e não sobreviventes apresentaram valores médios de $3,0 \pm 6,2$ pg/ml (0-19) vs $8,8 \pm 11,4$ pg/ml (0-34) no momento zero, $1,5 \pm 3,3$ pg/ml (0-10) vs $10,6 \pm 14,5$ pg/ml (0-39) nas 6 horas, $3,6 \pm 3,5$ pg/ml (0-10) vs $28,4 \pm 65,2$ pg/ml (0-22) nas 12 horas e $4,4 \pm 5,8$ pg/ml (0-16) vs $11,9 \pm 14,8$ pg/ml (0-38) nas 24 horas, respectivamente (Figura 1).

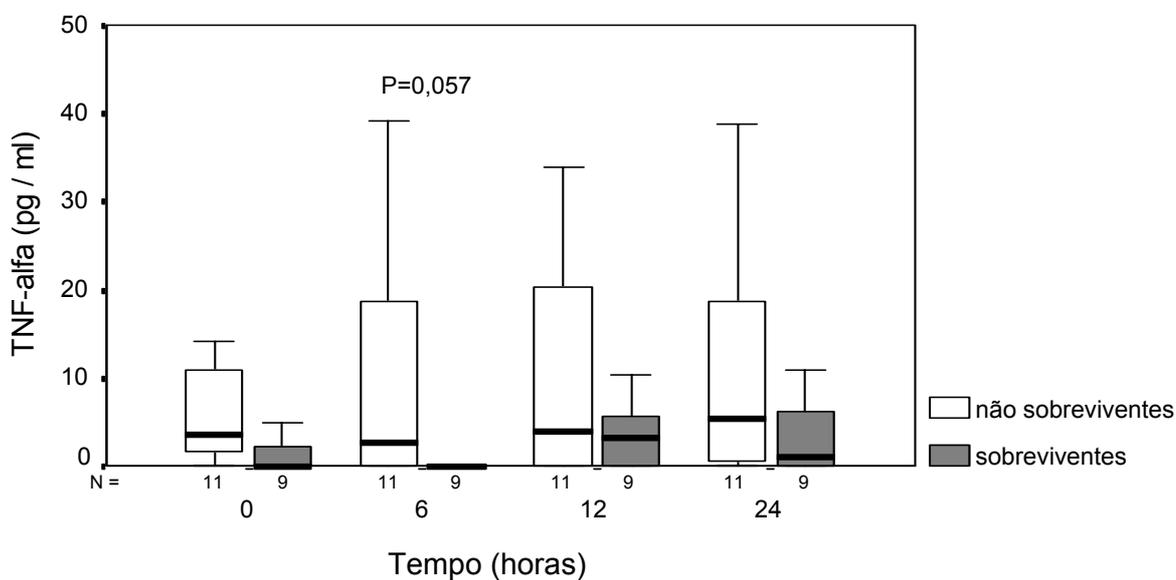


Figura 1. Diagrama de caixas ilustrando os níveis plasmáticos medidos de TNF- α em pacientes queimados para quatro pontos no tempo em sobreviventes e não sobreviventes. As linhas horizontais dentro das caixas são os valores da mediana, os limites superior e inferior das caixas são os percentis 75 e 25% respectivamente. As linhas verticais representam o desvio padrão.

Receptores Solúveis para TNF- α

Os níveis plasmáticos do sTNFR1 apresentaram valores significativamente mais elevados nos pacientes não sobreviventes quando comparados aos sobreviventes nos momentos 6h e 24h. Os valores médios observados nos sobreviventes e não sobreviventes foram 1803 ± 953 pg/ml (874-3772) vs 2983 ± 2009 pg/ml (763-6520) no momento zero, 1313 ± 581 pg/ml (484-2154) vs 2937 ± 1676 pg/ml (458-5770) nas 6h ($P=0,01$), 2287 ± 1074 pg/ml (1125-4492) vs 3570 ± 2236 pg/ml (1164-8643) nas 12 h e 2561 ± 804 pg/ml (1244-3994) vs 4548 ± 1436 pg/ml (2294-7126) nas 24h ($P=0,002$), respectivamente (Figura 2).

Os níveis plasmáticos do sTNFR2 foram significativamente mais elevados nos pacientes não sobreviventes somente nas 6 h quando comparados aos sobreviventes. Os valores médios obtidos em sobreviventes e não sobreviventes foram 3973 ± 1938 pg/ml (1891-7684) vs 4308 ± 1737 pg/ml (1428-6514) no momento zero, 2611 ± 1326 pg/ml (1335-5545) vs 4617 ± 1876 pg/ml (638-7576) nas 6h ($P=0,015$), 4205 ± 1662 pg/ml (2120-6748) vs 5022 ± 1662 pg/ml (2021-7940) nas 12h, 5780 ± 1258 pg/ml (4175-7364) vs 6034 ± 1032 pg/ml nas 24h, respectivamente (Figura3).

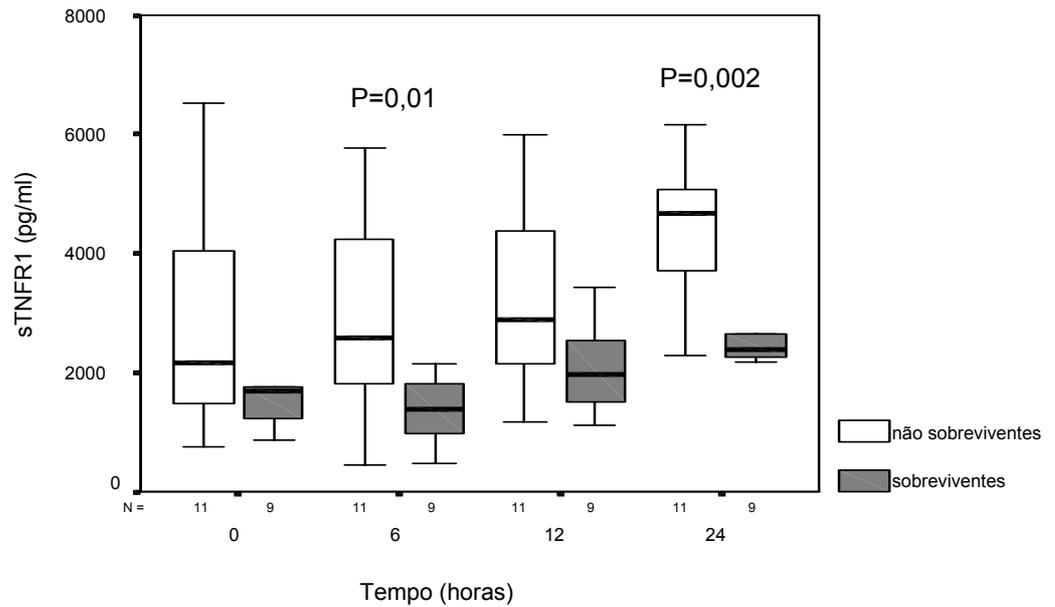


Figura 2. Diagrama de caixas ilustrando os níveis plasmáticos dos sTNFR1 em pacientes queimados para quatro diferentes pontos no tempo em sobreviventes e não sobreviventes. As linhas horizontais dentro das caixas mostram os valores medianos, os limites superior e inferior das caixas mostram os percentis 25 e 75%, respectivamente. As linhas verticais representam o desvio padrão.

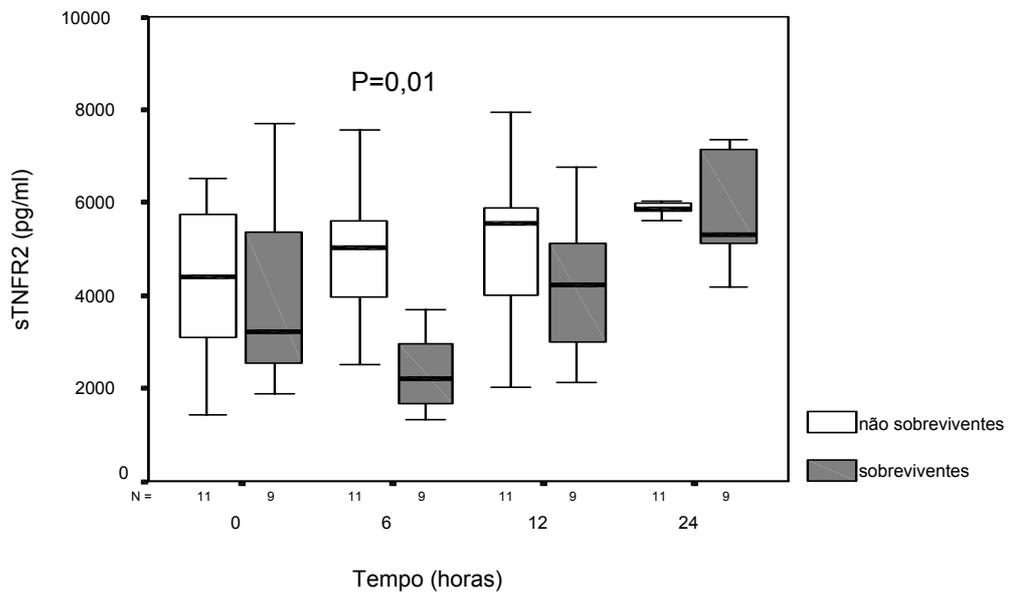


Figura 3. Diagrama de caixas ilustrando os níveis plasmáticos dos sTNFR2 em pacientes queimados em quatro diferentes pontos no tempo em sobreviventes e não sobreviventes. As linhas horizontais dentro das caixas mostram os valores medianos, os limites inferior e superior das caixas são os percentis 25 e 75 %, respectivamente. As linhas verticais representam o desvio padrão.

Níveis plasmáticos de endotelina-1

Os níveis plasmáticos de ET-1 foram semelhantes em ambos os grupos em todos os momentos do tempo e não foram significativamente mais elevados em não sobreviventes. Os valores médios para ET-1 foram, em sobreviventes e não sobreviventes, $1,53 \pm 0,86$ pg/ml (0-2,8) vs $1,7 \pm 1,4$ pg/ml (0-5,1) no momento zero, $1,46 \pm 0,94$ pg/ml (0,3-3,2) vs $2,96 \pm 3,3$ pg/ml (0-11,5) nas 6 h, $2,3 \pm 1,2$ pg/ml (0,2-4,6) vs $2,7 \pm 3,2$ pg/ml (0-10,9) nas 12h, $2 \pm 1,2$ pg/ml (0,5-4,4) vs $1,3 \pm 2$ pg/ml (0-7) nas 24h, respectivamente (Figura 4).

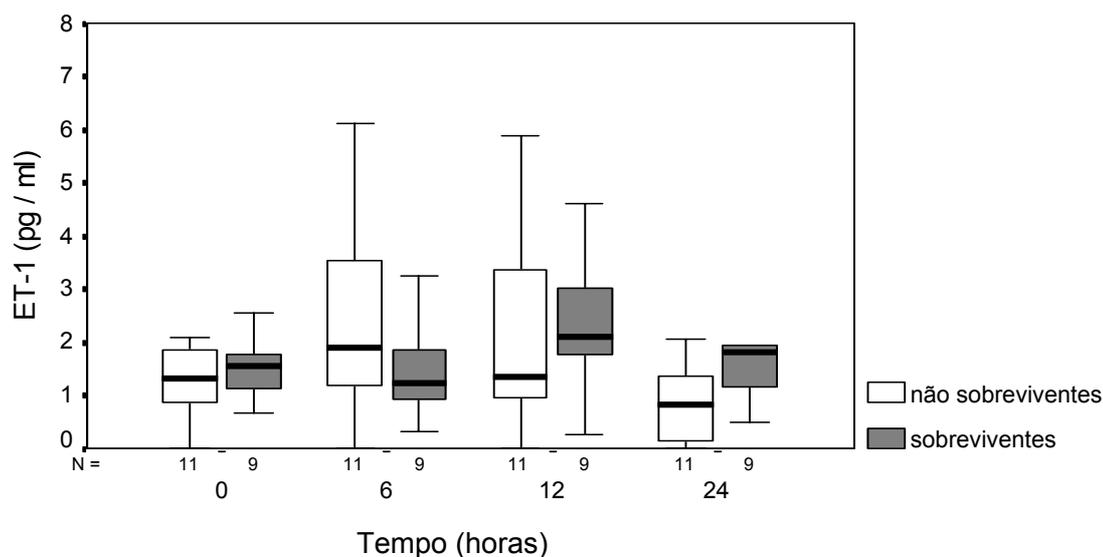


Figura 4. Diagrama de caixas ilustrando os níveis plasmáticos de ET-1 medido em pacientes queimados em quatro diferentes pontos no tempo em sobreviventes e não sobreviventes. As linhas horizontais dentro das caixas mostram os valores medianos, os limites inferiores e superior das caixas são os percentis 25 e 75%, respectivamente. As linhas verticais representam o desvio padrão.

Risco relativo, valores preditivos positivos e negativos dos marcadores biológicos

Risco relativo, valores preditivos positivos e negativos para mortalidade medidos em todos os pontos do tempo para TNF- α , sTNFR1, sTNFR2 e ET-1 são mostrados na Tabela 2. Os níveis de TNF- α nas 12h e de sTNFR1 nas 6h apresentaram valores preditivos positivos para mortalidade de 100%. O valor preditivo negativo para mortalidade nas 12h para o TNF- α foi de 52% e para o sTNFR1 nas 6h foi de 70%. Com riscos relativos de 2,1 (IC=1,8-3,52) e 3,25 (IC=1,44-7,35), respectivamente.

Tabela 2. Risco relativo e valores preditivos positivos para mortalidade para pontos de corte específicos do TNF- α , sTNFR1, sTNFR2 e ET-1

	RR (IC 95%)	VPP (%)	VPN (%)
TNF-α			
0	2,6 (0,98-7,2)	80%	70%
6	1,9 (0,96-3,9)	83%	57%
12	2,1 (1,28-3,5)	100%	52%
24	1,5 (0,53-2,6)	71%	54%
STNFR1			
0	1,75 (0,73-4,1)	71%	60%
6	3,25 (1,2-8,79)	100%	69%
12	1,7 (0,73-4,1)	71%	60%
24	3,3 (1,2-8,79)	89%	73%
STNFR2			
0	1,75 (0,73-4,1)	70%	60%
6	3,3 (1,2-8,79)	89%	73%
12	1,75 (0,73-4,1)	70%	60%
24	1,2 (0,53-2,6)	60%	42%
ET-1			
0	0,83(0,37-1,8)	50%	39%
6	1,75 (0,73-4,1)	70%	60%
12	0,57 (0,24-1,3)	43%	39%
24	0,57 (0,24-1,3)	40%	30%

IC= Intervalo de confiança; RR= Risco relativo; VPP= Valor preditivo positivo; VPN= Valor preditivo negativo

Pontos de corte em pg/ml às 0h: TNF- α =6,1; sTNFR1=2452; sTNFR2=4157; ET-1=1,6. Pontos de corte para em pg/ml às 6h: TNF- α =6,5; sTNFR1=2206; sTNFR2=3714; ET-1=2,3. Pontos de corte em pg/ml às 12h: TNF- α =17,2; sTNFR1=2992; sTNFR2=4655; ET-1=2,6. Pontos de corte em pg/ml às 24h: TNF- α =8,5; sTNFR1=3654; sTNFR2=5920; ET-1=1,6.

Correlação entre marcadores biológicos e escore de APACHE II e superfície corporal queimada

Foram demonstrados correlações significativas entre os escores de APACHE II e níveis de sTNFR1 e de ET-1 em vários pontos no tempo. No entanto houve fraca correlação entre níveis de TNF- α e escore APACHE II (Tabela 3). Houve correlação entre SCQ e os níveis do sTNFR1 nos momentos zero, 6h e 12h e com os níveis de TNF- α somente nas 12h (Tabela 4). Finalmente, não foi encontrada correlação entre SCQ e o escore de APACHE II.

Tabela 3. Coeficiente de correlação de Pearson entre escore de APACHE II e marcadores biológicos em diferentes pontos do tempo

	TNF- α	sTNFR1	sTNFR2	ET-1
0h	-0,02	0,51*	0,29	0,45*
6h	0,10	0,50*	0,47*	0,60*
12h	0,27	0,47*	0,44	0,57*
24h	0,42	0,59*	0,45*	0,37*

*P <0,05

Tabela 4. Coeficiente de correlação de Pearson entre SCQ e marcadores biológicos em diferentes pontos do tempo

	TNF- α	sTNFR1	sTNFR2	ET-1
0h	0,25	0,44*	0,25	0,40
6h	0,28	0,47*	0,34	0,30
12h	0,60*	0,54*	0,01	0,31
24h	0,29	0,40	0,1	-0,09

* P \leq 0,05

DISCUSSÃO

As citocinas são mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese de várias síndromes, freqüentemente relacionadas à disfunção de múltiplos órgãos e importante disfunção cardiovascular. Níveis elevados desses mediadores, especialmente do TNF- α que é o marcador mais amplamente estudado, estão implicados com um prognóstico sombrio em várias situações clínicas tais como sepse e insuficiência cardíaca (5, 7). As queimaduras podem ser vistas de uma maneira semelhante às aquelas situações nas quais esses mediadores desempenham um papel importante. Contudo, o seu papel para prever mortalidade em pacientes queimados apenas recentemente tem sido explorados. Neste estudo, nós procuramos investigar um perfil seqüencial precoce do TNF- α , seus receptores solúveis e de ET-1 em pacientes grandes queimados, num período prévio ao início da infecção.

Características clínicas dos pacientes

A seleção dos pacientes para este estudo foi rigorosa quanto ao tempo após o acidente, pois foram incluídos apenas aqueles que chegaram à unidade de queimados do HPS até 6 horas após o acidente. A população em estudo foi similar a de outros estudos com relação ao tempo de entrada no estudo (aproximadamente 3h após o acidente) (10), mas foi mais estrita quanto à média da SCQ. De fato, nós estudamos um grupo mais homogêneo já que somente casos com $SCQ \geq 30\%$ foram incluídos. Estes aspectos caracterizam nosso grupo como similares aos outros estudos quanto à gravidade (9, 10), o qual pode ser ilustrado pela presença de lesão inalatória em 60% dos casos e uma mortalidade de 55%. Diferentemente de estudos em sepse no qual o início do quadro séptico é muitas vezes indefinido, nas queimaduras o fator tempo é preciso, e facilita a interpretação do perfil temporal dos marcadores biológicos. A relativa precocidade no tempo da inclusão e o seguimento

por um curto período (24h de coletas de sangue) dos pacientes propiciaram o estudo uma condição clínica na qual a infecção ainda não estava instalada, pois se aceita que infecções raramente ocorrem em queimados antes das 48h (15). Isto é uma questão chave quando as citocinas são o principal fator em estudo, uma vez que é esperada que os níveis das citocinas vão aumentar na presença de infecção (16).

Como previsível, foram encontradas diferenças clínicas estatisticamente significativas entre sobreviventes e não sobreviventes, relacionadas ao APACHE II e a SDMO. Houve também associações significativas entre APACHE II e níveis dos marcadores biológicos, especialmente sTNFR1 e ET-1. Isto vem ao encontro de estudos prévios mostrando associações similares, indicando que a combinação de variáveis fisiológicas e biológicas podem contribuir para predizer um prognóstico adverso em pacientes gravemente enfermos (10, 13).

Níveis circulantes de TNF- α

Existe um consenso geral de que os níveis aumentados de TNF- α estejam associados com sepse grave e choque séptico, implicando numa apresentação clínica mais grave; porém seu papel como um marcador prognóstico permanece controverso (17). De fato, estratégias para bloquear a atividade do TNF- α na sepse falharam em fornecer resultados clínicos favoráveis (18, 19). Há um interesse crescente em dissecar o papel do TNF- α em queimados já que uma intensa reação imunoinflamatória ocorre nesta condição. Yamada e colaboradores demonstraram que os níveis de TNF- α imediatamente após queimadura não diferiram significativamente entre sobreviventes e não sobreviventes. Entretanto quando a infecção ocorria, os níveis de TNF- α mostraram-se elevados sendo um indicador de gravidade e prognóstico nesta condição (9, 10). Marano e colaboradores também obtiveram resultados similares, pois em seu estudo, os níveis circulantes de TNF- α foram mais aumentados em pacientes com queimadura e sepse do que naqueles com

queimaduras sem sepse; esta observação foi também correlacionada com um risco de mortalidade aumentado (8).

Em nosso estudo, os níveis plasmáticos de TNF- α foram determinados numa fase muito precoce da queimadura, propiciando o estudo de pacientes num período livre de infecção. Encontramos níveis aumentados em todos os momentos em relação aos valores controles. É possível que se a infecção estivesse presente, os níveis pudessem alcançar valores muito elevados, reproduzindo os resultados encontrados por Marano e colaboradores. Além disso, encontramos um valor preditivo positivo para mortalidade de 100% nas 12h, assim é possível que mesmo na fase precoce da queimadura, o TNF- α possa ser um indicador prognóstico de gravidade. Os nossos dados adicionam novas informações relacionadas ao aspecto temporal possivelmente devido ao desenho deste estudo. Intervalos de coleta curtos são particularmente úteis para descrever o padrão das citocinas, conhecidas por terem meia vida limitadas (20). Finalmente, os níveis de TNF- α não se correlacionaram com o escore de APACHE II e somente os valores do momento 12h mostraram correlação com a SCQ.

Níveis dos receptores solúveis do TNF- α

Diferentemente dos níveis do TNF- α , os níveis dos receptores solúveis do TNF em pacientes queimados mostraram-se mais elevados em não sobreviventes quando comparado aos sobreviventes (10). Esses receptores solúveis do TNF também parecem ser importantes para predizer prognóstico em outras doenças, tais como a insuficiência cardíaca (21). Em nosso estudo observou-se níveis significativamente aumentados do sTNFR1 nos momentos 6h e 24h e níveis do sTNFR2 nas 6h nos não sobreviventes quando comparado aos sobreviventes. Além disso níveis aumentados de sTNFR1, nos momentos iniciais, correlacionaram-se melhor com a SCQ e com o escore de APACHE II do que os níveis de sTNFR2. Os

níveis de sTNFR1 nas 6h apresentaram um valor preditivo positivo para mortalidade de 100%.

Analisando o conjunto dos nossos achados sobre o TNF- α e seus receptores, observa-se que sTNFR1 apresenta um melhor desempenho tanto como indicador de gravidade quanto para prever mortalidade. Estes resultados apoiam a idéia de que o comportamento dos receptores solúveis pode ser mais informativo do que do próprio TNF- α . Acredita-se que os receptores solúveis do TNF- α de fato modulam a atividade do TNF- α após o TNF- α agir sobre as células alvo, e após isso há então uma clivagem dos receptores celulares, os quais são liberados na circulação, encerrando-se então a meia vida do TNF- α (20). Assim, as medidas dos receptores solúveis poderiam ser interpretadas como substitutas da atividade biológica do TNF- α . Poderia então ser postulado que quanto mais TNF- α foi sintetizado, subseqüentemente mais receptores do TNF serão liberados na circulação.

Níveis de endotelina-1

Em pacientes com sepse os níveis circulantes de ET-1 estão aumentados (22). Nós demonstramos recentemente que a determinação precoce de ET-1 em pacientes com choque séptico tem um forte valor preditivo para mortalidade (5). Em pacientes queimados níveis aumentados de ET-1 têm sido demonstrados por alguns autores (12,13). No entanto, a associação deste achado com prognóstico reservado permanece controversa. Enquanto Huribal e colegas mostraram que níveis elevados de ET-1 em pacientes queimados estavam associados a um prognóstico adverso, Nakae e colegas mostraram que somente quando a infecção complica a queimadura é que a ET-1 poderia estar associada a uma mortalidade elevada (12, 13).

Embora neste estudo os níveis de ET-1 em pacientes queimados estivessem mais elevados do que aqueles encontrados em controles normais (relativo a dados encontrados em nossos próprios estudos prévios (23)) não foi encontrada diferença

comparando sobreviventes aos não sobreviventes. Estes resultados são semelhantes àqueles de Huribal e colaboradores, que também estudaram pacientes em um período livre de infecção, embora em nossas observações diferentemente destes autores, foi realizado um perfil seqüencial precoce de ET-1. Apesar disso, embora a ET-1 não pareça ser útil como marcador prognóstico nesta situação, ainda podemos inferir que as ações deletérias da ET-1 como intensa vasoconstrição da microvasculatura e hipóxia possam ter ocorrido. Esta idéia pode ser apoiada pelo fato de que ET-1 correlacionou-se significativamente com a gravidade do escore APACHE II. Contrariamente, os níveis de ET-1 não estavam correlacionados com a SCQ pelo menos nas primeiras 24h após o acidente.

Limitações do estudo

A interpretação dos resultados contidos neste estudo deve levar em consideração certas limitações metodológicas. Primeiramente, o período das primeiras 24h após o acidente para analisar o perfil dos marcadores biológicos, se por um lado nos oferece um período livre de infecção, por outro este período pode ser muito curto para mostrar aumentos significativos e adicionais nos mediadores inflamatórios e/ou na ET-1. Segundo, devido às limitações técnicas, lesão inalatória foi diagnosticada somente por critérios clínicos. Isto pode ter levado a um excessivo e impróprio número de casos de inalação.

Conclusões

Neste estudo nós demonstramos a importância da determinação temporal de marcadores biológicos, em um período livre de infecção, com o objetivo de identificar pacientes queimados com um prognóstico sombrio. Talvez de todos os marcadores estudados em diferentes pontos do tempo, os níveis do sTNFR1 nas 6h constituam o melhor marcador. Ainda deve ser elucidado se esta observação somente indica um marcador do curso clínico ou alternativamente, ações deletérias específicas de

componentes do TNF- α e seus receptores solúveis que poderiam merecer intervenções diretas no quadro das queimaduras.

REFERÊNCIAS

1. Arturson G. Pathophysiology of the burn wound and pharmacological treatment. *Burns*. 1996;22:255-274.
2. Pruitt B, Mason A. Epidemiological, demographic and outcome characteristics of burn injury. (1 ed.) London: Saunders Company, 1996. D H, ed. *Total Burn Care*;p.5-15.
3. Guy JS, Peck MD. Smoke Inhalation Injury: Pulmonary Implications. *Resp Care Journal*. 1999;3:388-402
4. Demling RH. Smoke inhalation injury. *New Horizons* 1993; 1: 422-434
5. Brauner J, Rohde L, Clausell N. Circulating endothelin-1 and tumor necrosis factor- α : early predictors of mortality in patients with septic shock. *Inten Care Med*. 2000;26:305-313.
6. Froom A, Bemelmans M, Greve J, van Linden C, Burman W. Increased plasma concentrations of soluble tumor necrosis factor receptor in sepsis syndrome: correlation with plasma creatinine values. *Crit Care Med*. 1994;22:803-809.
7. Feldman A, Combes A, Wagner D, Kadakaomi T, Kubota T, et al. The role of the tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:537-544
8. Marano MA, Fong Y, Moldawer LL, Wei H, Calvano S, et al. Serum cachetin/ tumor necrosis factor- α in critically ill patients with burns correlates with infection and mortality. *Surg Gynec Obst*. 1990;170:32-38.

9. Yamada Y, Endo S, Inada K. Plasma cytokine levels in patients with severe burn injury - with reference to the relationship between infection and prognosis. *Burns*. 1996;22:587-593.
10. Yamada Y, Endo S, Inada K, Nakae H, Nasu W, et al. Tumor necrosis factor- α and tumor necrosis factor receptor I, II levels in patients with severe burns. *Burns*. 2000;26:239-244.
11. Levin R. Endothelins. *N Engl J Med*. 1995;333:356-363.
12. Huribal M, Cunningham M, Daiuto M, Pleban W, Mc Millen M. Endothelin and prostaglandin E2 levels increase in patients with burns. *J Am Coll Surg*. 1995;180:318-322.
13. Nakae H, Endo S, Inada K, Yamada Y, Takakuwa T, Yoshida M. Plasma levels of endothelin-1 and thrombomodulin in burn patients. *Burns*. 1996;22:594-597.
14. Knaus W, Draper E, Wagner D. APACHE II: A severity of disease classification system. *Crit Care Med*. 1985;13:818-829.
15. Hegggers J, Linares H, Edgar P, Villarreal C, Herndon D. Treatment of infections in burns. London: Saunders Company, 1996. N HD, ed. *Total Burn Care*; p.98-135.
16. Drost AC, Burleson DG, Cioffi WG, Mason AD, Pruitt BA. Plasma cytokines after thermal injury and their relationship to infection. *Ann Surg*. 1993;218:74-78.
17. Marks JD, Marks CB, Luce JM, Montgomery B, Turner J, Metz C, et al. Plasma necrosis factor- α in patients with septic shock. *Am Rev Resp Dis*. 1990;141:94-97.
18. Wherry JC, Pennington JE, Wenzel RT. Tumor necrosis factor- α and the therapeutic potential of anti-tumor factor antibodies. *Crit Care Med*. 1993;21:Suppl:S436-S440.

19. Abraham E, Wunderink R, Silverman H, et al. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor in patients with sepsis syndrome: a randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. *JAMA*. 1995;273:934-941.
20. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: An updated review of its biology. *Crit Car Med*. 1993; 21: S415-S422.
21. Rauchhaus M, Doehner W, Francis D, Davos C, Kemp M, et al. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2000;19: 3060-3067.
22. Pittet J, Morel D, Hemsén A, Gunning K, Lacroix J, et al. Elevated plasma endothelin-1 concentrations are associated with severity of illness in patients with sepsis. *Ann Surg*. 1991;213:261-268.
23. Seligman B, Biolo A, Polanczyk CA, Gross JL, Clausell N. Increased plasma levels of endothelin-1 and von Willebrand factor in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care*. 2000; 23:1395-1400.

Predictive value for mortality of early detection of soluble receptors of TNF- α in burn patients

Cyntia Aguiar Ribeiro, Lissandro Tarso, René Busnello, Cristiane Andrade, Nadine Clausell

Intensive Care Unit Hospital Municipal de Pronto Socorro de Porto Alegre and Division
of Cardiology Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, Brazil

Running title: cytokines and mortality in burns

Address for correspondence:

Dr. Nadine Clausell
Division of Cardiology
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350 room 2060
Porto Alegre, RS – Brazil – 900035-003
Phone: 55 316 8344; FAX 55 342 4834
e-mail: clausell@portoweb.com.br

ABSTRACT

INTRODUCTION. Burn injury is associated with intense immunoinflammatory activity; however, early sequential profiling of circulating levels of TNF- α , TNF soluble receptors and of endothelin (ET)-1 (a potent vasoconstrictor) in patients with burn injury remains unclear.

METHODS. Twenty patients with burn injury with total burn surface area (TBSA) = 30% were enrolled within less than 6h from the accident. Blood samples were drawn at time zero, 6, 12, 24 h to sequentially measure TNF- α , TNF- α 1 and 2 soluble receptors (sTNFR1 and sTNFR2) and ET-1 levels using ELISA assays.

RESULTS. Age, TBSA and inhalation injury were not significantly different among survivors (n=10; 30 \pm 13 years, TBSA 40 \pm 12%) and non survivors (n=11, 38 \pm 15 years, TBSA 56 \pm 20%). sTNFR1 levels were increased in non survivors (2937 \pm 1676 pg/ml; 4548 \pm 1436 pg/ml) compared to survivors (1313 \pm 561 pg/ml; 2561 \pm 804 pg/ml) at 6 h and 24 h, respectively (P =0.01 and 0.002), while sTNFR2 levels were significantly increased in non survivors (4617 \pm 1876 pg/ml vs. 2611 \pm 1326pg/ml) only at 6 h (P =0.015). Elevated levels of sTNFR1 at 6h and of TNF- α at 12h configured positive (100% for both markers) and negative (70 and 52%) predictive values for mortality, respectively; relative risk 3.25 and 1.2, respectively; confidence intervals of 1.4 – 7.3 and 1.28 – 3.52, respectively.

CONCLUSION. Increased levels of sTNFR1 and sTNFR2 were higher at 6h in non survivors patients with burns. TNF- α and ET-1 levels were similar in non survivors and survivors. Very early determination of sTNFR1 and sTNFR2 may help to identify patients at higher risk for adverse outcome in severe burn injury.

INTRODUCTION

Burns are relatively common lesions requiring multidisciplinary actions in order to reduce morbidity and to prevent mortality. In patients with large burn areas, higher than 30% of total burn surface area (TBSA), marked cardiovascular changes occur leading to circulatory shock. It is believed that this is a complex process involving disturbances at the microcirculation level where simple volume reposition may not be sufficient to control patient deterioration (1, 2). Moreover, when inhalation injury occurs, usually in 10 to 20 % of burn patients, mortality can vary from 30 to 90% (3). It appears that in this setting, there is more prominent inflammatory reaction, more severe imbalance of blood flow distribution, increased risk of infections and more frequent involvement of multiple organs (4).

Inflammatory mediators, called cytokines, are known to be involved in the pathogenesis of organ dysfunction in critically ill patients. Cytokines can play multiple roles contributing to hemodynamic instability. More specifically, we have recently shown that increased levels of tumor necrosis factor (TNF)- α detected early after the diagnosis of septic shock are associated to higher mortality (5). Furthermore, TNF- α has its biological activity modulated by two types of cell receptors of 55 and 75kD molecular weight, sTNFR1 and sTNFR2, respectively. In sepsis, it appears that detection of these soluble receptors in the circulation is also indicative of worse prognosis (6) It is suggested that cardiodepressor effects of TNF- α can be operative in the development of poor outcome in patients with septic shock (7). In recent years, there is growing interest in studying cytokines related to burn injury as some reports also indicate that these markers are upregulated in this setting. In fact, increased levels of TNF- α and of TNF soluble receptors have been shown in burn patients but its association with outcome remains controversial (8, 9, 10).

In addition to inflammatory mediators, other biological markers also are thought to play important roles in critically ill patients (11). Endothelins are potent vasoconstrictor agents, which are also elevated in sepsis and appear to be associated with mortality (5). Similarly to studies involving TNF- α , endothelin (ET)-1 has recently been shown to be increased in burn patients, but a more precise early profile description of the ET-1 behavior is lacking in this condition. Moreover, it is unclear whether ET-1 levels are related to morbidity and mortality in burn patients (12, 13).

As high mortality rates with rapid deterioration are feared in burn patients, identification of early predictors of poor outcome may help to guide differentiated therapeutic approaches. In this study we sought to investigate early and sequentially the profile of circulating levels of TNF- α , its soluble receptors and of ET-1 in severe burn patients with ≥ 30 % TBSA, having the first blood sample collected within 6 hours of accident and serially up to the first 24 hours.

METHODS

Study population

Patients admitted to the Intensive Care Unit – Burn Division from Hospital de Pronto de Socorro with a TBSA \geq 30% caused by flame or scald within 6 hours of the accident were considered candidates to participate in the study. Excluding criteria were: electrical burn lesions, age less than 16 years old, pregnancy, decompensated heart failure, uremia, neoplasia, auto-immune disorders, recent cardiovascular events and use of steroids. Before enrollment, patients or a legal representative signed an informed consent agreeing to participate into the study. The ethics and research committees from Hospital de Pronto Socorro and from Hospital de Clínicas de Porto Alegre previously approved the protocol.

APACHE II score was obtained from all cases at entry (14). Routine management of the patients followed standard protocol using Parkland formula according to the decisions from the intensive care team, without interference from the investigators. Similarly, all medical decisions regarding use of antibiotics, nutritional support and surgery requirements were also carry out independently from the study protocol. All events were recorded until death or hospital discharge.

Blood sampling

Immediately after arrival at the hospital (time 0) and at 6, 12 and 24h thereafter, a 10 ml blood sample was collected from the patients into an EDTA-containing tube. The material was immediately centrifuged at 3000 rpm during 20 minutes and the obtained plasma was stored frozen at -70° for posterior combined analyses. TNF- α , sTNFR1 and sTNFR2 and ET-1 were then measured by ELISA assays, using samples in duplicates and run simultaneously to minimize assay variability (R & D Systems, MN, USA). For ET-1 measurements, an extraction step using an extraction solvent (acetone;1 NHCl:water (40:1:5) preceded the final assay.

Inferior detection limits for the markers, according to the manufacturer were: 1.6 pg/ml for TNF- α , 7.8 pg/ml for both sTNFR1 and 2 and 4.4 pg/ml for ET-1. Expected values from normal controls according to the manufacturer were: < 15.6 pg/ml for TNF- α , 914 pg/ml (484 to 1407 pg/ml) for sTNFR1, 1500 pg/ml (829 to 2262 pg/ml) for sTNFR2 and 0.6 pg/ml (0.3 to 0.9 pg/ml) for ET-1.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD) for variables with normal distribution. Chi-square was used to compare categorical variables. Comparisons between survivors and non survivors were performed using Mann-Whitney test and Student *t* test as appropriated followed by Bonferroni's test. Pearson correlation test was used to study associations between levels of markers and other variables. Relative risk was calculated using the mean value of the markers to establish cut-off points. Significance level was established at $P < 0.05$.

RESULTS

Clinical characteristics of the patients

Twenty patients formed the study population: nine were survivors and 11 were non-survivors. Age was not different between groups (30 ± 13 years in survivors and 38 ± 15 years in non survivors). Entry time (first blood sampling) into the study in relation to the injury time was similar in both groups (3.7 h for survivors and 3.8 h for non survivors). TBSA was also not different comparing both groups ($40 \pm 12\%$ in survivors and $56 \pm 20\%$ in non survivors, $P = 0.058$). As expected, APACHE II score (15.4 ± 6.2 versus 9.8 ± 5.2 , $P = 0.048$) and multiple organ dysfunction syndrome (MODS) (2.6 ± 1.6 versus 0.44 ± 0.7 , $P = 0.002$) were different comparing non-survivors to survivors, respectively. Finally, there was no difference in the incidence of inhalation injury comparing groups ($P = 0.15$), while in the whole group there was a 60% incidence of this type of lesion carrying a mortality rate of 55%. Individual data for clinical characteristics are shown in Table 1.

Table 1. Clinical characteristics of the study population

Patient #	Gender	Age (Years)	APACHE II	TBSA (%)	MODS	Inhalatio n	Survival (Days)
Survivors							
1	M	25	7	30	0	N	Discharge
2	M	34	13	30	2	Y	Discharge
3	M	59	17	38	0	N	Discharge
4	M	32	14	42	1	Y	Discharge
5	M	17	16	65	0	N	Discharge
6	M	31	8	40	1	Y	Discharge
7	M	18	4	30	0	N	Discharge
8	M	37	3	54	0	N	Discharge
9	M	19	7	35	0	N	Discharge
Mean ± SD		30 ± 13	9.8 ± 5.2 *	40 ± 12	0.4±0.7 *		
Non survivors							
1	M	25	8	52	0	N	3
2	M	47	14	84	2	Y	12
3	F	32	28	52	5	Y	2
4	F	42	7	31	2	Y	44
5	M	24	20	100	4	Y	2
6	M	54	13	40	3	Y	4
7	M	56	23	44	3	Y	3
8	M	20	14	62	5	Y	14
9	M	31	12	62	0	Y	5
10	M	26	18	42	3	Y	5
11	M	65	13	47	2	N	57
Mean ± SD		38 ± 15	15.4 ± 6.2 *	56 ± 20	2.6± 1.6 *		13.7±18.8

M= Male; F= Female; Y = Yes; N = No; APACHE II = Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score; MODS =

Multiple Organ Dysfunction Syndrome; * P< 0,05 survivors versus non survivors

Plasma levels of tumor necrosis factor- α

Levels of TNF- α were similar in non-survivors and survivors in all time-points, but increased related to control values. Specifically, values for survivors and non survivors were 3.0 ± 6.2 pg/ml (0-19 pg/ml) *versus* 8.8 ± 11.4 pg/ml (0-34 pg/ml), respectively at time zero, 1.5 ± 3.3 pg/ml (0-10 pg/ml) *versus* 10.6 ± 14.5 pg/ml (0-39 pg/ml) respectively at 6 h, 3.6 ± 3.5 pg/ml (0-10 pg/ml) *versus* 28.4 ± 65.2 pg/ml (0-22 pg/ml) respectively at 12 h and 4.4 ± 5.8 pg/ml (0-16 pg/ml) *versus* 11.9 ± 14.8 pg/ml (0-38 pg/ml) respectively at 24 h. Figure 1.

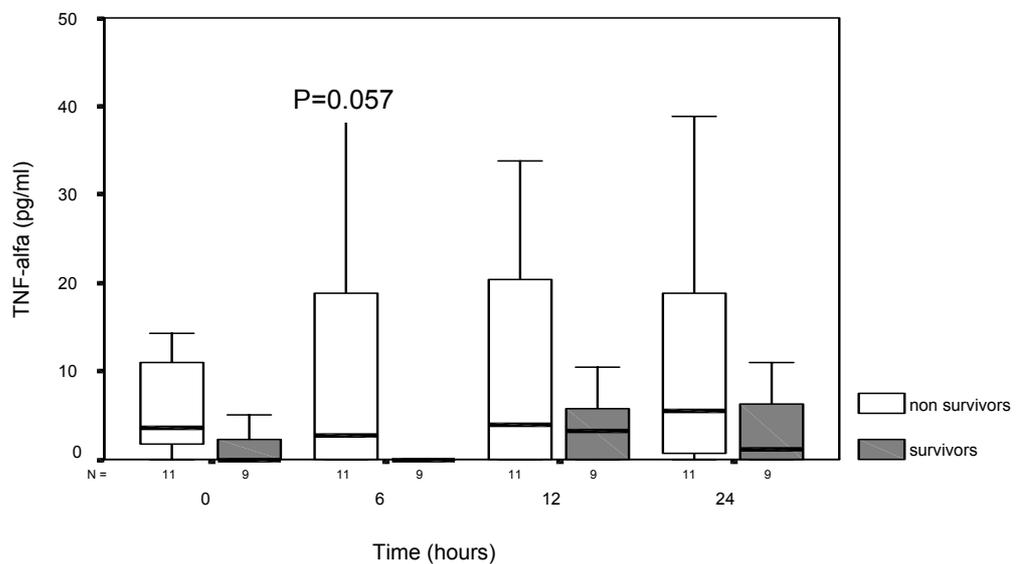


Figure 1. Box and whisker plots illustrating plasma levels of TNF- α in burn patients at the four different time-points in survivors and non-survivors. Horizontal lines inside boxes are median values, inferior and superior limits of boxes are 25 and 75% percentiles, respectively. Vertical lines represent standard deviation.

Levels of soluble receptors of TNF- α

Plasma levels of sTNFR1 were significantly higher in non-survivors comparing to survivors at 6 and 24 h. At zero and 24 h values were similar. Specifically, values for survivors and non survivors were 1803 ± 953 pg/ml (874-3772) *versus* 2983 ± 2009 pg/ml (763-6520) at time zero, 1313 ± 581 pg/ml (484-2154) *versus* 2937 ± 1676 pg/ml (458-5770) at 6 h ($P = 0.01$), 2287 ± 1074 pg/ml (1125-4492) *versus* 3570 ± 2236 pg/ml (1164-8643) at 12 h and 2561 ± 804 pg/ml (1244-3994) *versus* 4548 ± 1436 pg/ml (2294-7126) at 24h ($P = 0.002$), respectively. Figure 2.

Plasma levels of sTNFR2 were significantly elevated in non survivors compared to survivors only at 6 h. Specifically, values for survivors and non survivors were 3973 ± 1938 pg/ml (1891-7684) *versus* 4308 ± 1737 pg/ml (1428-6514) at time zero, 2611 ± 1326 pg/ml (1335-5545) *versus* 4617 ± 1876 pg/ml (638-7576) at 6h ($P = 0.015$), 4205 ± 1662 pg/ml (2120-6748) *versus* 5022 ± 1662 pg/ml (2021-7940) at 12h, 5780 ± 1258 pg/ml (4175-7364) *versus* 6034 ± 1032 pg/ml (4071-8317) at 24h, respectively. Figure 3.

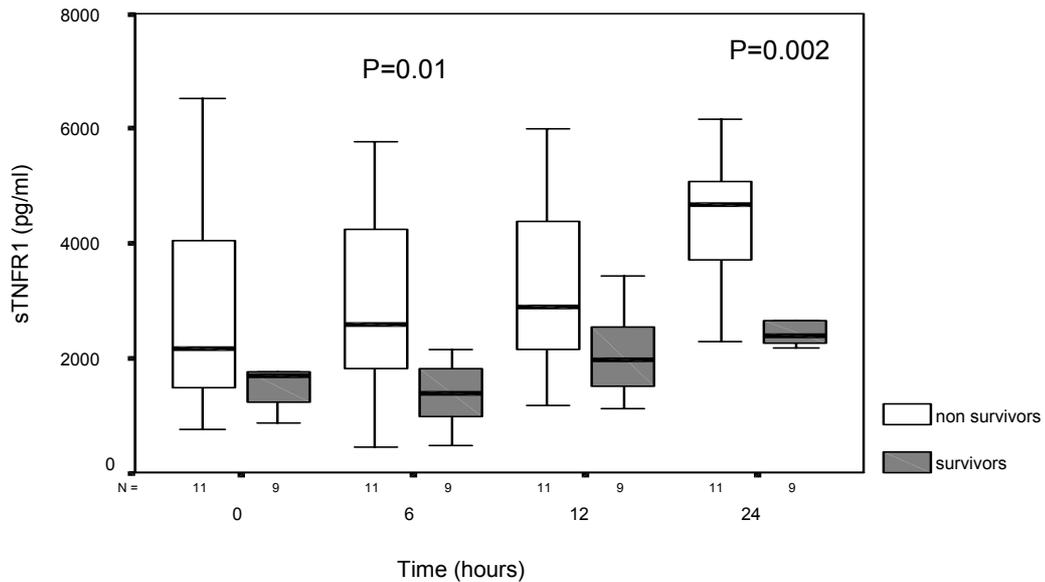


Figure 2. Box and whisker plots illustrating plasma levels of sTNFR1 in burn patients at the four different time-points in survivors and non-survivors. Horizontal lines inside boxes are median values, inferior and superior limits of boxes are 25 and 75% percentiles, respectively. Vertical lines represent standard deviation.

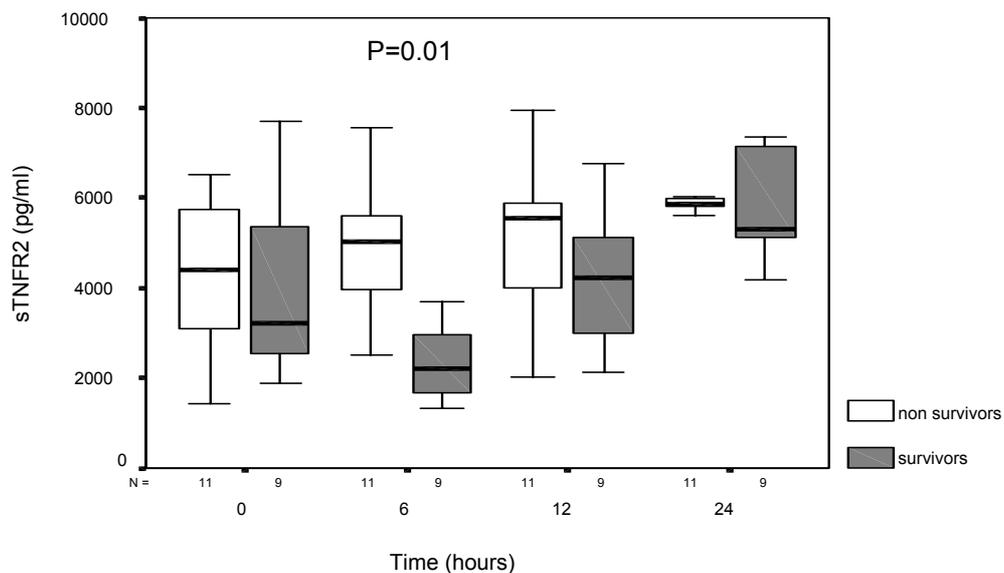


Figure 3. Box and whisker plots illustrating plasma levels of sTNFR2 in burn patients at the four different time-points in survivors and non survivors. Horizontal lines inside boxes are median values, inferior and superior limits of boxes are 25 and 75% percentiles, respectively. Vertical lines represent standard deviation.

Plasma levels of ET-1

Plasma levels of ET-1 were not different between groups in any of the time-points. Values for ET-1 in survivors and non survivors were 1.53 ± 0.86 pg/ml (0-2.8) versus 1.7 ± 1.4 pg/ml (0-5.1) at time zero, 1.46 ± 0.94 pg/ml (0.3-3.2) versus 2.96 ± 3.3 pg/ml (0-11.5) at 6 h, 2.3 ± 1.2 pg/ml (0.2-4.6) versus 2.7 ± 3.2 pg/ml (0-10.9) at 12h, 2 ± 1.2 pg/ml (0.5-4.4) versus 1.3 ± 2 pg/ml (0-7) at 24h, respectively. Figure 4.

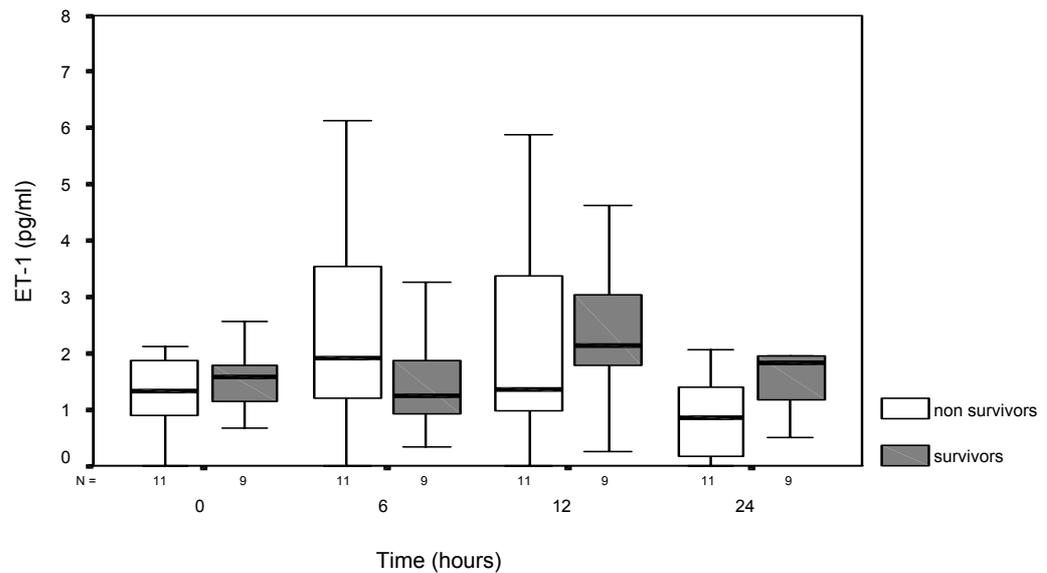


Figure 4. Box and whisker plots illustrating plasma levels of ET-1 in burn patients at the four different time-points in survivors and non-survivors. Horizontal lines inside boxes are median values, inferior and superior limits of boxes are 25 and 75% percentiles, respectively. Vertical lines represent standard deviation.

Positive and negative predictive values and relative risk for biological markers

Levels of TNF- α at 12h and of sTNFR1 at 6h showed predictive values of 100% for mortality, whereas the negative predictive values for those markers at the same time-points were 52 and 70%, respectively. Relative risks were 2.1 (CI = 1.8 – 3.52) and 3.25 (CI = 1.44 – 7.35) for TNF- α and for sTNFR1 at the same time-points, respectively. Individual data for positive and negative predictive values and relative risks for all markers at all time-points are shown in Table 2.

Table 2. Relative risks, positive and negative predictive values of mortality for TNF- α , sTNFR1, sTNFR2 and ET-1 at specific time-points.

	RR (CI 95%)	PPV (%)	NPV (%)
TNF-α			
0 h	2.6 (0.98-7.2)	80%	70%
6 h	1.9 (0.96-3.9)	83%	57%
12 h	2.1 (1.28-3.5)	100%	52%
24 h	1.5 (0.53-2.6)	71%	54%
sTNFR1			
0 h	1.75 (0.73-4.1)	71%	60%
6 h	3.25 (1.2-8.79)	100%	69%
12 h	1.7 (0.73-4.1)	71%	60%
24 h	3.3 (1.2-8.79)	89%	73%
sTNFR2			
0 h	1.75 (0.73-4.1)	70%	60%
6 h	3.3 (1.2-8.79)	89%	73%
12 h	1.75 (0.73-4.1)	70%	60%
24 h	1.2 (0.53-2.6)	60%	42%
ET-1			
0 h	0.83(0.37-1.8)	50%	39%
6 h	1.75 (0.73-4.1)	70%	60%
12 h	0.57 (0.24-1.3)	43%	39%
24 h	0.57 (0.24-1.3)	40%	30%

CI = confidence interval; RR= relative risk; PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value

Cut-off points (pg/ml) at 0h: TNF- α = 6.1; sTNFR1 = 2452; sTNFR2 = 4157; ET-1=1.6.

Cut-off points (pg/ml) at 6h: TNF- α = 6.5; sTNFR1 = 2206; sTNFR2 = 3714; ET-1 = 2.3.

Cut-off points (pg/ml) at 12h: TNF- α = 17,2; sTNFR1 = 2992; sTNFR2 = 4655; ET-1 = 2.6.

Cut-off points (pg/ml) at 24h: TNF- α = 8.5; sTNFR1 = 3654; sTNFR2 = 5920; ET-1 = 1.6.

Correlation between biological markers and APACHE II score and total burn surface area

Significant correlations were observed between APACHE II and levels of sTNFR1 and 2 and ET-1 at various time-points. However, levels of TNF- α were not correlated to APACHE II. Table 3. Regarding TBSA, levels of sTNFR1 showed significant correlation at time zero, 6 and 12 h, whereas TNF- α levels only at 12 h had similar profile. Finally, ET-1 levels did not correlate with TBSA in any of the time-points. Table 4.

Table 3. Pearson correlation between APACHE II score and biological markers at different time-points

	TNF- α	sTNFR1	sTNFR2	ET-1
0 h	-0.02	0.51*	0.29	0.45*
6 h	0.10	0.50*	0.47*	0.60*
12 h	0.27	0.47	0.44	0.57*
24 h	0.42	0.59*	0.45*	0.37*

*P < 0.05

Table 4. Pearson correlation between TBSA and biological markers at different time-points.

	TNF- α	sTNFR1	sTNFR2	ET-1
0 h	0.25	0.44*	0.25	0.40
6 h	0.28	0.47*	0.34	0.30
12 h	0.60*	0.54*	0.01	0.31
24 h	0.29	0.40	0.1	-0.09

*P<0.05

DISCUSSION

Cytokines are inflammatory mediators involved in the pathogenesis of various syndromes, generally involving multiple organ dysfunction and important cardiovascular impairment. Elevated levels of these mediators, especially TNF- α as the most widely studied marker, are implicated in poor outcome in clinical scenarios such as sepsis and heart failure (5, 7). Burns can be regarded as no different from other critical conditions in which these mediators are important players. However, their role as predictors of mortality in burn patients is only recently beginning to be explored. In this study, we sought to investigate the early profile of TNF- α , its soluble receptors and of ET-1 in burn patients with large TBSA, previous to the appearance of infections.

Clinical characteristics of patients

Selection of patients was strictly guided by the extension of the burn injury and the possibility of inclusion within 6 h of accident. The study population was thus similar to other studies with respect to entry time (approximately 3 h post-accident) (10), but was stricter regarding the TBSA range. In fact, we studied a more homogenous group since only cases with TBSA \geq 30% were included. This aspect characterizes our group as similar to that of other studies regarding severity (9, 10), which can be illustrated by the presence of inhalation injury in 60% of the cases with a 55% mortality. Differently from studies in sepsis, where the beginning of infection can be difficult to ascertain, in this study the timing of entry relative to injury moment was precisely determined. The relatively early inclusion and short follow-up (up to 24 h of blood sampling) of patients provided the opportunity to study a clinical condition in which infection had not been installed, since it is accepted that infection rarely complicates burns before 48 h (15). This is a key factor when cytokines are the main issue to be explored, since it is expected that cytokine's levels will rise in the presence of infection (16).

Clinical differences between survivors and non-survivors were, as expected, significant regarding APACHE II and the development of MODS. There were also significant associations between APACHE II and levels of biological markers, especially sTNFR1 and ET-1. This is in accordance with previous studies showing similar associations, indicating that the combination of physiologic and biologic variables may contribute to predict adverse outcome in critically ill patients (10, 13).

Plasma levels of TNF- α

There is a general concept that elevated levels of TNF- α are present in septic shock or severe sepsis, implicating in more severe clinical presentation; however, its predictive role for poor outcome remains controversial (17). In fact, strategies to block TNF- α activity in sepsis failed to provide favorable results (18, 19). There is growing interest to dissect the role of TNF- α in burns since an intense immunoinflammatory reaction ought to take place. Yamada and co-workers demonstrated that immediately after burn injury, levels of TNF- α were not different in survivors and non-survivors. However, when infection complicated the course of the process, elevated levels of TNF- α were indicative of adverse prognosis and severity (9, 10). Marano and colleagues also made similar observations, since in their study significantly elevated levels of TNF- α were present in burn patients with sepsis compared to burn patients without sepsis; this observation was also correlated to increased mortality risk (8).

In our study, the early and sequential profiling of markers, including TNF- α , provided the opportunity to study an infection-free period. We also showed elevated levels of this marker relative to control values in both survivors and non-survivors. Although levels in non-survivors were higher compared to survivors in all time-points, there was no statistical significance. It is possible that had infection be present; levels would reach even higher values reproducing similar data to those from Marano and co-workers. Moreover, at the 12 h time-point, levels of TNF- α had a positive predictive

value for mortality of 100 % in our study. Our data add new information regarding timing aspects possibly due to study design. Shorter sampling intervals are particularly useful to describe pattern of cytokines, known to have limited half-lives (20). Finally, levels of TNF- α did not correlate with APACHE II and only the value at 12 h showed correlation with TBSA.

Levels of soluble receptors of TNF- α

Differently from TNF- α , levels of TNF receptors have been shown to be different comparing survivors and non-survivors with burns as Yamada and colleagues showed (10). This is comparable to the importance as predictors that soluble receptors for TNF have gained associated with other diseases, such as heart failure (21). In our study, increased levels of sTNFR1 at 6 and 24 h and of sTNFR2 at 6 h were significantly higher in non-survivors compared to survivors. Moreover, sTNFR1 levels at 6 h carried a predictive value for mortality of 100%. As for correlation with APACHE II and TBSA, sTNFR1 correlated better compared to sTNFR2.

Taken together our observations of TNF- α and its receptors indicate that sTNFR1 has a better performance both as indicator of severity and predictor of mortality. This finding supports the notion that behavior of soluble receptors can be more informative than that of TNF- α itself. It is thought that TNF- α receptors, in fact modulate TNF- α activity, whereby after TNF- α acts upon at a target cell, there is cleavage of cell receptors released to the circulation followed by termination of TNF- α half-life (20). Thus, measurement of soluble receptors could be interpreted as surrogate for TNF- α biological activity. It could be postulated that the more TNF- α had been synthesized; more TNF receptors are subsequently released.

Plasma levels of ET-1

In patients with sepsis, ET-1 circulating levels are elevated (22). We have recently shown that early determination of ET-1 in patients with septic shock has a powerful positive predictive value for mortality (5). Similarly, in burns, increased levels of ET-1 have been demonstrated by others (12, 13). However, its association with prognosis remains controversial. While Huribal and colleagues have shown that elevated levels of ET-1 in patients with burns were associated to poor outcome, Nakae and co-workers have demonstrated that, only when infection complicates burns, ET-1 can be associated to higher mortality (12, 13).

In this study, although levels of ET-1 in patients with burns were higher than those of normal controls (relative to manufactures and our own previous studies (23)) there was no difference comparing survivors and non-survivors. These results are similar to those from Huribal and colleagues, which also studied patients in an infection-free period, although in our observations differently from theirs, sequential profiling of ET-1 early in the course of burns was carried out. Although ET-1 did not appear to be useful as a prognostic marker in this setting, it is conceivable that deleterious ET-1 actions, possibly intense vasoconstriction at the microvasculature level leading to tissue hypoxia occurred. This notion can be supported by the fact the ET-1 correlated significantly with the severity of APACHE II. On the contrary, ET-1 levels were not correlated with TBSA, at least within the first 24 h from the accident.

Limitations of the study

Our results should be interpreted considering study limitations and characteristics. Firstly, the time-frame of the first 24 h from accident to analyze biological markers profile, if in one hand provided an infection-free period, might have been too short to show further and significant increases in inflammatory mediators and/or ET-1. Secondly, due to technical limitations, inhalation injury was only clinically diagnosed. This may have led to excessive/inappropriate inhalation cases called.

Conclusion

In this study we have showed the importance of timely determination of biological markers, in an infection-free period, in order to identify burn patients with a poorer prognosis. It appears that from all the markers studied at the different time-points, sTNFR1 levels at 6 h constituted the best marker. It remains to be elucidated whether this observation only indicates a marker of clinical course or alternatively, specific deleterious actions from TNF- α compounds that could merit direct intervention in the setting of burns.

REFERENCES

1. Arturson G. Pathophysiology of the burn wound and pharmacological treatment. *Burns*. 1996;22:255-274.
2. Pruitt B, Mason A. Epidemiological, demographic and outcome characteristics of burn injury. (1 ed.) London: Saunders Company, 1996. D H, ed. *Total Burn Care*;p.5-15.
3. Guy JS, Peck MD. Smoke Inhalation Injury: Pulmonary Implications. *Resp Care Journ*. 1999;3:388-402
4. Demling RH. Smoke inhalation injury. *New Horizons*. 1993;1:422-434
5. Brauner J, Rohde L, Clausell N. Circulating endothelin-1 and tumor necrosis factor- α : early predictors of mortality in patients with septic shock. *Inten Care Med*. 2000;26:305-313.
6. Froom A, Bemelmans M, Greve J, van Linden C, Burman W. Increased plasma concentrations of soluble tumor necrosis factor receptor in sepsis syndrome: correlation with plasma creatinine values. *Crit Care Med*. 1994;22:803-809.
7. Feldman A, Combes A, Wagner D, Kadakaomi T, Kubota T, et al. The role of the tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:537-544
8. Marano MA, Fong Y, Moldawer LL, Wei H, Calvano S, et al. Serum cachetin/ tumor necrosis factor- α in critically ill patients with burns correlates with infection and mortality. *Surg Gynec and Obstetrics*.1990;170:32-38.
9. Yamada Y, Endo S, Inada K. Plasma cytokine levels in patients with severe burn injury - with reference to the relationship between infection and prognosis. *Burns*. 1996;22:587-593.
10. Yamada Y, Endo S, Inada K, Nakae H, Nasu W, et al. Tumor necrosis factor- α and tumor necrosis factor receptor I, II levels in patients with severe burns. *Burns*. 2000;26:239-244.

11. Levin R. Endothelins. *N Engl J Med.* 1995;333:356-363.
12. Huribal M, Cunningham M, Daiuto M, Pleban W, Mc Millen M. Endothelin and prostaglandin E2 levels increase in patients with burns. *J Am Coll Surg.* 1995;180:318-322.
13. Nakae H, Endo S, Inada K, Yamada Y, Takakuwa T, Yoshida M. Plasma levels of endothelin-1 and thrombomodulin in burn patients. *Burns.* 1996;22:594-597.
14. Knaus W, Draper E, Wagner D. APACHE II: A severity of disease classification system. *Crit Care Med.* 1985;13:818-829.
15. Hegggers J, Linares H, Edgar P, Villarreal C, Herndon D. Treatment of infections in burns. London: Saunders Company, 1996. N HD, ed. *Total Burn Care*;p.98-135.
16. Drost AC, Burleson DG, Cioffi WG, Mason AD, Pruitt BA. Plasma cytokines after thermal injury and their relationship to infection. *Ann Surg.* 1993;218:74-78.
17. Marks JD, Marks CB, Luce JM, Montgomery B, Turner J, Metz C, et al. Plasma tumor necrosis factor- α in patients with septic shock. *Am Rev Resp Dis.* 1990;141:94-97.
18. Wherry JC, Pennington JE, Wenzel RT. Tumor necrosis factor- α and the therapeutic potential of anti-tumor factor antibodies. *Crit Care Med.* 1993;21:Suppl:S436-S440.
19. Abraham E, Wunderink R, Silverman H, et al. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor in patients with sepsis syndrome: a randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial . *JAMA.* 1995;273:934-941.
20. Tracey KJ, Cerami A . Tumor necrosis factor: An updated review of its biology. *Crit Care Med.* 1993;21:S415-S422.

- 21.** Rauchhaus M, Doehner W, Francis D, Davos C, Kemp M, et al. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2000;19:3060-3067.
- 22.** Pittet J, Morel D, Hemsén A, Gunning K, Lacroix J, et al. Elevated plasma endothelin-1 concentrations are associated with severity of illness in patients with sepsis. *Ann Surg*. 1991;213:261-268.
- 23.** Seligman B, Biolo A, Polanczyk CA, Gross JL, Clausell N. Increased plasma levels of endothelin-1 and von Willebrand factor in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care*. 2000;23:1395-1400.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Estamos conduzindo um trabalho que visa melhorar o atendimento do paciente queimado neste Hospital e gostaríamos de contar com a sua participação. Este tipo de trabalho, também realizado em outros lugares do mundo, procura identificar alterações precoces (no momento da internação hospitalar) no sangue que nos indiquem futuramente a gravidade da queimadura. O Sr.(a) está internado neste Hospital com diagnóstico de grande queimado. Se o nosso trabalho for positivo, poderemos no futuro tratar diferentemente pacientes como o Sr.(a), e talvez melhorar as chances de recuperação.

No entanto, sua participação no atual trabalho não trará nenhum benefício direto ao tratamento médico administrado à sua pessoa (ou família). Da mesma forma, o Sr.(a) poderá, a qualquer momento, suspender a participação no estudo sem com isto incorrer em nenhum prejuízo do seu (ou familiar) atendimento médico. O registro deste estudo tem caráter confidencial, podendo ser requerido pelo Sr.(a) ou familiar e que os resultados sejam apresentados ao Sr.(a), ou familiar, ou ao seu médico.

À sua participação neste trabalho envolve a coleta de pequenas amostras de sangue, total de 40 ml, em um período de 24 horas, coletadas preferencialmente de um local que já esteja puncionado. Se o Sr. (Sra.) concordar, por favor, assine na linha indicada abaixo.

Garantimos absoluto sigilo e anonimato aos participantes incluídos no nosso trabalho.

Estamos à sua disposição para qualquer informação sobre o nosso estudo pelo telefone 330-9888 (Ramal 9451) UTI de Queimados do HPS, nas terças-feiras à tarde, falar com a Dra.Cyntia .

Paciente (responsável)

Dra . Cyntia Aguiar Ribeiro

Dra .Nadine Clausell

**DOSAGEM SEQUENCIAL DE TNF- α , SEUS
RECEPTORES SOLÚVEIS E ET-1 COMO VALOR
PREDITIVO DE MORTALIDADE NO GRANDE QUEIMADO**

Nome: _____ Registro: _____

Sexo: M () F ()

Idade: _____ anos

Data do acidente: ___/___/___ às _____ horas

Data inter. Queimados: ___/___/___ às _____ horas

1ª coleta : _____ horas 1ºHt: _____ 2ºHt: _____ 3º Ht: _____ 4ºHt: _____

Data alta: ___/___/___

Data do óbito : ___/___/___ Causa do óbito: _____

S.C.Q: _____ %

Agente: _____

APACHE: _____

Lesão inalatória : Sim () Não () Critérios : _____

Sepse : Sim () Data : ___/___/___ Não ()

Tax>38 ou <36 ;FC >90 ;FR>20 ou PaCO₂<32
;Leucóc>12000 ou <4000 ou >10% bastões.

Cultivos positivos: Sim () Não ()

Infecção : Pele () Data : ___/___/___ I.T.U.() Data : ___/___/___

Cateter() Data : ___/___/___ Resp. () Data : ___/___/___

Sangue() Data : ___/___/___

Disfunção Orgânica Múltipla

DATA:

Circulatória	/	/	/	/	/
Respiratória	/	/	/	/	/
Renal	/	/	/	/	/
Gastrointest	/	/	/	/	/
Coagulação	/	/	/	/	/
Cerebral	/	/	/	/	/
Hepática	/	/	/	/	/

Total :

D.M.O.S.(critérios de Knaus) :

1.Insuf. Cardiovascular:

- a) FC < 54/min
- b) PAM < ou = 49 mmHg
- c) Taqui ventri e/ou FV
- d) pH < ou = 7.24 com PaCO₂ < 49

2.Insuf. Respiratória:

- a) FR < ou = 5/min ou > ou = 49/min
- b) PaCO₂ > ou = 50mmHg
- c) PAaO₂ > 350mmHg
- d) dependência do ventilador após 4 dias

3.Insuf. Renal :

- a) diurese < ou = 479 ml/24h ou < ou = 159 ml/8h
- b) Uréia > ou = 200
- c) Creat > ou = 3.5

4.Insuf. Hematológica:

- a) Leucócitos < ou = 1000
- b) Plaquetas < ou = 20.000
- c) Ht < 20%

5.Insuf. Neurológica:

Glasgow < ou = 6 (ausência de sedação)

6.Insuf. Hepática :

- a) TP > 4s do controle (ausência de anticoagulante)
- b) Bilirrubina > 6 mg%