

Mike Yoshio Hamasaki¹, Hermes Vieira Barbeiro¹,
Heraldo Possolo de Souza¹, Marcel Cerqueira
César Machado¹, Fabiano Pinheiro da Silva¹

sRAGE no choque séptico: um potencial biomarcador de mortalidade

sRAGE in septic shock: a potential biomarker of mortality

1. Disciplina de Emergências Clínicas,
Universidade de São Paulo - São Paulo (SP), Brasil.

RESUMO

Objetivo: Avaliar e compreender as implicações clínicas dos níveis plasmáticos de uma isoforma solúvel de um receptor de produtos finais de glicação avançada (do inglês *receptor for advanced glycation end products* - sRAGE) em diferentes fases da sepse.

Métodos: Os valores do sRAGE sérico em pacientes divididos nos grupos controle na unidade de terapia intensiva, sepse grave, choque séptico e recuperação de choque séptico foram analisados do ponto de vista estatístico para avaliar a quantidade (Kruskal-Wallis), variabilidade (teste de Levine) e correlação (teste Spearman rank) em relação a certos mediadores inflamatórios (IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, IP-10, G-CSF, MCP-1, IFN- γ e TNF- α).

Resultados: Não se observaram modificações nos níveis de sRAGE entre os grupos; contudo o grupo com choque

séptico demonstrou diferenças na variabilidade do sRAGE em comparação aos demais grupos. Foi relatada, no grupo com choque séptico, uma correlação positiva com todos os mediadores inflamatórios.

Conclusão: Os níveis de sRAGE se associaram com desfechos piores nos pacientes com choque séptico. Entretanto, uma análise de correlação estatística com outras citocinas pró-inflamatórias indicou que as vias que levam a esses desfechos são diferentes, dependendo dos níveis de sRAGE. A realização de estudos futuros para elucidar os mecanismos fisiopatológicos que envolvem sRAGE nos modelos de sepse será de grande importância clínica para possibilitar o uso seguro desse biomarcador.

Descritores: Marcadores biológicos; Inflamação; Sepse; Choque séptico; Sobrevida

Conflitos de interesse: Nenhum.

Submetido em 11 de setembro de 2014

Aceito em 13 de novembro de 2014

Autor correspondente:

Fabiano Pinheiro da Silva
Laboratório de Emergências Clínicas (LIM-51)
da Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455, sala 3.189
CEP: 01246-000 - São Paulo (SP), Brasil
E-mail: pinheirofabiano@hotmail.com

Editor responsável: Felipe Dal Pizzol

DOI: 10.5935/0103-507X.20140060

INTRODUÇÃO

A sepse associa-se diretamente a respostas inflamatórias sistêmicas graves. Um dos mecanismos por meio do qual a infecção contribui para a presença da via de resposta inflamatória persistente é mediada pela ligação de ligantes ao receptor. O receptor para produtos finais de glicação avançada (do inglês *receptor for advanced glycation end products* - RAGE) e receptores *toll-like* (TLRs) pertencem ao grupo de receptores de reconhecimento padrão.⁽¹⁾

Os ligantes para RAGE incluem AGEs, a família S100 de proteínas, peptídeo beta-amiloide, HGMG1, MAC1 e LPS. A interação entre RAGE e seus ligantes é promovida e mediada pela cascata do fator de transcrição NF- κ B, culminando com a produção aumentada de mediadores inflamatórios. Semelhantemente a alguns membros da família TLR (TLR-2 e TLR-4), os RAGE têm uma isoforma solúvel (sRAGE) que se origina da conexão alternativa do mRNA e/ou de clivagem proteolítica.^(2,3)

Existe atualmente um debate na literatura com relação às funções do sRAGE. Alguns pesquisadores acreditam que o sRAGE age como um receptor “falso”, que impede o aumento dos mediadores pró-inflamatórios, enquanto outros pesquisadores relacionam o sRAGE com a propagação da resposta inflamatória, por ligar-se com receptores CD11b nos leucócitos.^(4,5) As diferentes opiniões são, em parte, justificadas, considerando-se a falta de dados publicados com relação ao sRAGE. Para ajudar a elucidar as funções do sRAGE, este estudo teve como objetivo avaliar a correlação entre os níveis plasmáticos de sRAGE, a resposta inflamatória e a sobrevivência em pacientes com graus variados de sepse.

MÉTODOS

Delineamento do estudo

Este foi um estudo prospectivo de coorte realizado em uma das unidades de terapia intensiva (UTI) do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e foi concebido como parte do projeto BRISK (*Brazilian Initiative for Sepsis Knowledge*), lançado em 2009 para investigar muitos dos aspectos moleculares da sepse. Pacientes cirúrgicos, de trauma e com síndrome coronária são geralmente admitidos a outras UTI de nosso hospital, o que torna nossa população muito homogênea. Sepse, acidente vascular cerebral, nível alterado de consciência, edema pulmonar e asma/doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) são as cinco causas que respondem por 90% das admissões incluídas neste estudo.

Foram excluídos pacientes com menos de 18 anos de idade, gestantes, com doenças malignas disseminadas recebendo quimioterapia, HIV positivos, com doença hepática avançada, condições de fim de vida, assim como os que recusaram seu consentimento para participação no estudo. Os pacientes restantes foram divididos em quatro grupos: (1) controle na UTI (pacientes admitidos à UTI por causas não infecciosas); (2) grupo com sepse grave (pacientes admitidos à UTI por sepse grave ou que desenvolveram sepse grave durante a permanência); (3) grupo com choque séptico (pacientes admitidos à UTI por choque séptico ou que desenvolveram choque séptico durante a permanência na UTI); e (4) grupo de recuperação do choque séptico (pacientes que se recuperaram do choque séptico). Foram colhidos dados e amostras de sangue dos pacientes quando da admissão ou quando do diagnóstico de sepse grave ou choque séptico pela equipe médica. Definiram-se sepse grave e choque séptico conforme proposto em 1992, segundo a Conferência do Comitê de Consenso da *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM)*.⁽⁶⁾ Analisaram-se os níveis séricos de sRAGE e mediadores inflamatórios utilizando os kits MILLIPLX[®]

MAP com base na tecnologia da Luminex[®] Technology (EMD Millipore, Massachusetts, Estados Unidos).

Análise estatística

Foram utilizados três diferentes métodos estatísticos: (1) o teste de Kruskal-Wallis (para comparar a quantidade de sRAGE plasmático entre os grupos controle na UTI, sepse grave, choque séptico e recuperação do choque séptico); (2) o teste de Levine (utilizado para comparar a variabilidade do nível plasmático de sRAGE entre os grupos controle na UTI, sepse grave, choque séptico e recuperação do choque séptico); e (3) o teste de Spearman (utilizado para identificar a relevância da correlação entre os níveis de sRAGE e mediadores inflamatórios nos diferentes contextos).

RESULTADOS

O teste de Kruskal-Wallis não mostrou qualquer diferença entre os níveis plasmáticos de sRAGE nos pacientes com diferentes graus de sepse; contudo, a análise de variabilidade (teste de Levine) indicou que o grupo de pacientes com choque séptico foi significativamente diferente em comparação aos demais grupos (Figura 1). As diferenças observadas na análise de variabilidade podem ser explicadas, parcialmente, pela avaliação da correlação entre os níveis plasmáticos de sRAGE com os valores de alguns mediadores inflamatórios.

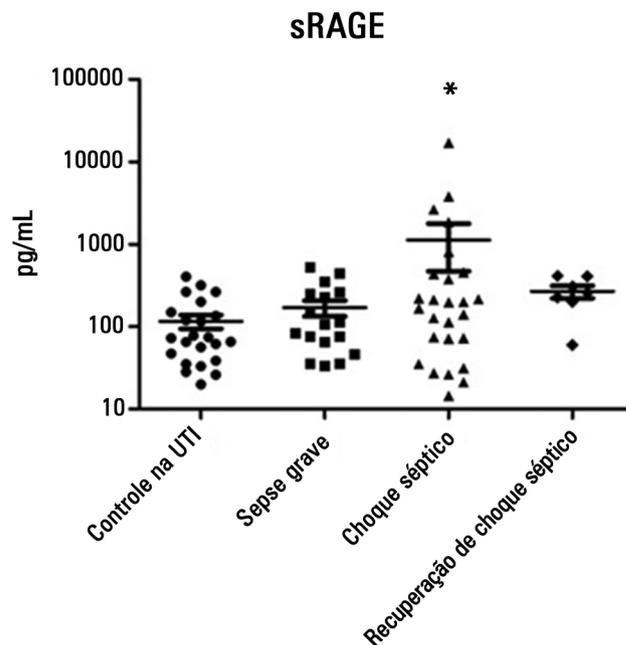


Figura 1 - Níveis séricos (pg/mL) de sRAGE em diferentes estágios de sepse. O nível de sRAGE no grupo Choque Séptico apresentou variação significativa, detectada pelo teste de Levine (representado no gráfico pelo símbolo *). UTI - unidade de terapia intensiva.

Foi observada correlação positiva entre fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e sRAGE em todos os grupos, exceto no de pacientes que se recuperaram do choque séptico. Houve correlação positiva entre interferon gama (IFN- γ) e sRAGE nas condições de sepse grave e choque séptico. Os pacientes que desenvolveram choque séptico e os que se recuperaram dessa condição demonstraram uma correlação positiva entre os níveis de sRAGE e de proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), e entre sRAGE e de fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF). Interleucina (IL) 1 α , IL-6, IL-8, IL-10 e interferon gama induzido por proteína 10 (IP-10) apresentaram uma correlação positiva e estatisticamente significativa com sRAGE apenas nos pacientes com choque séptico (Tabela 1).

Dependendo dos resultados dos testes de variabilidade e correlação, a avaliação da sobrevivência se focalizou no grupo de pacientes que desenvolveram choque séptico. Foram encontrados níveis elevados (>500pg/mL) de sRAGE em cinco pacientes, sendo que quatro pacientes (80%) vieram a falecer. Foram encontrados níveis diminuídos de sRAGE (<100pg/mL) em sete pacientes, sendo que cinco deles (71%) faleceram. Dentre todos os pacientes incluídos no grupo com choque séptico (n=26), 46,1% (n=12) morreram na UTI. Além disso, 75% (n=9) dos pacientes que morreram tinham níveis elevados ou diminuídos de sRAGE. Esses resultados indicam que níveis elevados e diminuídos de sRAGE (em conjunto) representam sensibilidade de 75%, especificidade de 85%, valor preditivo positivo de 75% e valor preditivo negativo de 85% em relação ao prognóstico de óbito em pacientes com choque séptico.

Para verificar o grau de correlação entre sRAGE e mediadores inflamatórios associados com a sobrevivência do paciente, o grupo com choque séptico foi dividido, para análises adicionais de correlação entre pacientes com

choque séptico que sobreviveram e pacientes que faleceram. Com exceção da quimocina MCP-1, que compartilhou uma correlação significativa entre os dois grupos avaliados, todos os demais mediadores inflamatórios (IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, IP-10, G-CSF, IFN- γ e TNF- α) apresentaram uma correlação positiva significativa apenas no grupo de pacientes que morreram (Tabela 2).

Foi realizada uma análise de correlação para compreender quais mediadores inflamatórios se associam com óbito em concentrações de sRAGE aumentadas (>500pg/mL) ou reduzidas (<100pg/mL). O sRAGE apresentou correlações significativas com IL-1 α , IFN- γ e TNF- α em pacientes que apresentaram aumento nos níveis de sRAGE. Em contraste, o grupo de pacientes com diminuição dos níveis de sRAGE não apresentou qualquer correlação significativa com qualquer dos mediadores inflamatórios investigados (Tabela 2).

DISCUSSÃO

As cascatas de sinalização e ligantes para RAGE na literatura sugerem um papel fundamental desse receptor no processo inflamatório. Por tal razão, alguns estudos associaram o RAGE com várias patologias.⁽⁷⁾

O primeiro trabalho relativo a níveis plasmáticos aumentados de RAGE em pacientes com sepse é relativamente recente, tendo sido publicado por Bopp et al.⁽⁸⁾ Nesse estudo, pacientes com sepse grave e choque séptico (combinados em um único grupo) apresentaram aumento dos níveis de sRAGE no plasma em comparação aos controles saudáveis. Além disso, pacientes sépticos que morreram tinham níveis plasmáticos aumentados de sRAGE em comparação aos que sobreviveram. Foram recentemente descritos dados similares relatando níveis plasmáticos aumentados de sRAGE com óbito em pacientes sépticos.⁽⁹⁾

Tabela 1 - Análise de correlação com sRAGE nos diferentes estágios de sepse

	Controle na UTI (N=23)		Sepse grave (N=17)		Choque séptico (N=26)		Recuperação de choque séptico (N=7)	
	r	Valor de p	r	Valor de p	r	Valor de p	r	Valor de p
IL-1 α	0,34	>0,05	0,37	>0,05	0,37	$\leq 0,05^*$	0,03	>0,05
IL-6	0,09	>0,05	0,08	>0,05	0,59	$\leq 0,01^*$	0,17	>0,05
IL-8	0,13	>0,05	0,01	>0,05	0,58	$\leq 0,01^*$	0,07	>0,05
IL-10	0,31	>0,05	0,13	>0,05	0,46	$\leq 0,01^*$	-0,07	>0,05
G-CSF	0,04	>0,05	0,02	>0,05	0,51	$\leq 0,01^*$	0,85	$\leq 0,05^*$
IFN- γ	0,46	>0,05	0,58	$\leq 0,05^*$	0,44	$\leq 0,05^*$	-0,42	>0,05
IP-10	0,44	>0,05	0,39	>0,05	0,46	$\leq 0,01^*$	-0,07	>0,05
MCP-1	0,01	>0,05	0,14	>0,05	0,76	$\leq 0,001^*$	0,82	$\leq 0,05^*$
TNF- α	0,47	$\leq 0,05^*$	0,47	$\leq 0,05^*$	0,56	$\leq 0,01^*$	0,46	>0,05

UTI - unidade de terapia intensiva; IL - interleucina; G-CSF - fator estimulador de colônias de granulócitos; IFN- γ - interferon gama; IP - interferon gama induzido por proteína-10; MCP - proteína quimiotática de monócitos; TNF- α - fator de necrose tumoral alfa. * Valores de $p \leq 0,05$.

Tabela 2 - Análise de correlação com sRAGE em pacientes com choque séptico

	Sobreviventes (N=14)				Não sobreviventes (N=12)			
	Total		Total		Com aumento de sRAGE (N=4)		Com diminuição de sRAGE (N=5)	
	r	Valor de p	r	Valor de p	r	Valor de p	r	Valor de p
IL-1 α	0,18	>0,05	0,58	$\leq 0,05^*$	0,96	$\leq 0,05^*$	0,10	>0,05
IL-6	0,30	>0,05	0,76	$\leq 0,01^*$	0,38	>0,05	0,70	>0,05
IL-8	0,46	>0,05	0,65	$\leq 0,05^*$	0,43	>0,05	0,30	>0,05
IL-10	0,05	>0,05	0,77	$\leq 0,01^*$	-0,24	>0,05	0,30	>0,05
G-CSF	0,04	>0,05	0,70	$\leq 0,01^*$	-0,19	>0,05	0,40	>0,05
IFN- γ	0,11	>0,05	0,70	$\leq 0,01^*$	0,99	$\leq 0,01^*$	-0,20	>0,05
IP-10	0,44	>0,05	0,69	$\leq 0,05^*$	0,69	>0,05	0,30	>0,05
MCP-1	0,64	$\leq 0,05^*$	0,77	$\leq 0,01^*$	0,24	>0,05	0,30	>0,05
TNF- α	0,18	>0,05	0,81	$\leq 0,01^*$	0,98	$\leq 0,01^*$	0,50	>0,05

IL - interleucina; G-CSF - fator estimulador de colônias de granulócitos; IFN- γ - interferon gama; IP - interferon gama induzido por proteína-10; MCP - proteína quimiotática de monócitos; TNF- α - fator de necrose tumoral alfa. * Valores de $p \leq 0,05$.

Embora os grupos tivessem organização diferente, os resultados do presente estudo não demonstram os mesmos aspectos descritos por Bopp et al.⁽⁸⁾ Inicialmente, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos níveis plasmáticos de sRAGE entre os diferentes graus de sepse (sepse grave e choque séptico), mesmo quando se comparou entre indivíduos que deram entrada na UTI por razões não infecciosas ou indivíduos que estavam em recuperação de choque séptico. Não se encontraram diferenças estatisticamente significantes entre pacientes que sobreviveram e pacientes que morreram na vigência de choque séptico, segundo o teste *t* de Student.

Nossos resultados indicaram uma diferença estatisticamente significativa na variabilidade de sRAGE no grupo com choque séptico em relação aos demais grupos (Figura 1). É possível que diminuições nos níveis sanguíneos de sRAGE possam estar associadas com aumento da mortalidade em choque séptico.

Os resultados da análise de correlação entre sRAGE e mediadores inflamatórios nos diferentes grupos (Tabela 1) sugerem que a correlação positiva entre TNF- α e sRAGE pode ser um fator importante no processo que se desenvolve durante um choque séptico, porque apenas os pacientes que se recuperaram do choque séptico deixaram de apresentar correlação estatisticamente significativa nessa análise. Semelhantemente, a correlação positiva entre IFN- γ e sRAGE pode consistir em uma diferença entre o grupo de indivíduos no grupo da UTI e o grupo que desenvolveu sepse grave. Finalmente, as correlações significantes entre sRAGE e IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10 e IP-10 só foram encontradas no grupo com choque séptico.

Os níveis plasmáticos de sRAGE parecem associar-se com seus ligantes. Estudo *in vitro* de Raucci et al.⁽¹⁰⁾ relatou

que quando ocorre a clivagem, os níveis gerais de RAGE aumentam. Semelhantemente, aumenta a quantidade de sRAGE no sobrenadante de células tratadas com HMGB1 (um dos ligantes para RAGE). Foram observados resultados similares no estudo de pacientes com níveis elevados de AGE.⁽¹¹⁾

Foi relatado que um aumento do nível de sRAGE seria um mecanismo protetor, pois sua presença no plasma contribui para a remoção ou neutralização de ligantes para RAGE, assim agindo como um receptor "falso".⁽⁴⁾ Contudo, Wang et al.⁽⁵⁾ relataram um efeito deletério do sRAGE no processo inflamatório, pois se ligaria aos receptores CD11b dos leucócitos, propagando assim a inflamação.

Nossos resultados a respeito da correlação estatística entre o número total de pacientes que sobreviveram e todos os que morreram (Tabela 2) indicaram que os pacientes que morreram apresentaram uma correlação positiva entre sRAGE e diversos mediadores pró-inflamatórios (IL-1 α , IL-6, IL-8, IP-10, IFN- γ e TNF- α).

No grupo de pacientes com níveis aumentados de sRAGE (>500pg/mL) e que morreram, foram observadas correlações positivas entre sRAGE e IL-1 α , IFN- γ e TNF- α (Tabela 2). Esses resultados são coerentes com os propostos por Wang et al.⁽⁵⁾, sugerindo que, durante o choque séptico, níveis elevados de sRAGE parecem se associar com desfechos piores, por meio de vias relacionadas com IL-1 α , IFN- γ e TNF- α .

Surpreendentemente observamos que níveis diminuídos de sRAGE no plasma (<100pg/mL) podem também estar correlacionados aos níveis mais elevados de mortalidade. Entretanto, não pudemos encontrar qualquer correlação com os mediadores inflamatórios investigados. Assim, são necessários mais estudos para elucidar as vias

relacionadas com os níveis diminuídos de sRAGE que levam a desfechos piores.

CONCLUSÃO

Observamos que níveis aumentados de sRAGE se associam com desfechos piores em pacientes com choque séptico; igualmente, níveis reduzidos de sRAGE se associam com aumento da mortalidade. Entretanto, a análise de correlação indicou que as vias que levam ao óbito associadas a aumento ou diminuição de níveis plasmáticos de sRAGE são diferentes. Serão de grande importância, para o uso seguro desse biomarcador, futuros estudos para elucidar os mecanismos fisiopatológicos desencadeados por sRAGE em sepse.

AGRADECIMENTOS

O presente estudo é parte de um estudo prospectivo de coorte em andamento e que foi delineado para armazenar dados clínicos e amostras biológicas destinadas a múltiplos projetos, denominado Projeto BRISK (*Brazilian Initiative for Sepsis Knowledge*). Pinheiro da Silva F é apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), com auxílio financeiro número 2009/17731-2 e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), com auxílio número 470539/2013-15. Gostaríamos de expressar nossa gratidão aos pacientes e seus familiares, por consentirem em tomar parte deste estudo.

ABSTRACT

Objective: To evaluate and understand the clinical implications of the plasma levels of a soluble isoform of a receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in different stages of sepsis.

Methods: Serum sRAGE values in patients who were divided into intensive care unit control, severe sepsis, septic shock and recovery from septic shock groups were statistically analyzed to assess quantity (Kruskal-Wallis), variability (Levine test) and correlation (Spearman rank test) with certain inflammatory mediators (IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, IP-10, G-CSF, MCP-1, IFN- γ and TNF- α).

Results: No changes in sRAGE levels were observed among the groups; however, the septic shock group showed differences

in the variability of sRAGE compared to the other groups. A positive correlation with all the inflammatory mediators was reported in the septic shock group.

Conclusion: sRAGE levels are associated with worse outcomes in patients with septic shock. However, a statistical correlation analysis with other proinflammatory cytokines indicated that the pathways leading to those outcomes are different depending on the sRAGE levels. Future studies to elucidate the pathophysiological mechanisms involving sRAGE in models of sepsis are of great clinical importance for the safe handling of this biomarker.

Keywords: Biological markers; Inflammation; Sepsis; Shock, septic; Survival

REFERÊNCIAS

1. Yamamoto Y, Harashima A, Saito H, Tsuneyama K, Munesue S, Motoyoshi S, et al. Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS. *J Immunol*. 2011;186(5):3248-57.
2. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med (Berl)*. 2005;83(11):876-86.
3. Maillard-Lefebvre H, Boulanger E, Daroux M, Gaxatte C, Hudson BI, Lambert M. Soluble receptor for advanced glycation end products: a new biomarker in diagnosis and prognosis of chronic inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48(10):1190-6.
4. Geroldi D, Falcone C, Emanuele E. Soluble receptor for advanced glycation end products: from disease marker to potential therapeutic target. *Curr Med Chem*. 2006;13(17):1971-8.
5. Wang Y, Wang H, Piper MG, McMaken S, Mo X, Opalek J, et al. sRAGE induces human monocyte survival and differentiation. *J Immunol*. 2010;185(3):1822-35.
6. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992;101(6):1644-55.
7. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response-the evidence mounts. *J Leukoc Biol*. 2009;86(3):505-12.
8. Bopp C, Hofer S, Weitz J, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, et al. sRAGE is elevated in septic patients and associated with patients outcome. *J Surg Res*. 2008;147(1):79-83.
9. Brodska H, Malickova K, Valenta J, Fabio A, Drabek T. Soluble receptor for advanced glycation end products predicts 28-day mortality in critically ill patients with sepsis. *Scand J Clin Lab Invest*. 2013;73(8):650-60.
10. Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, et al. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J*. 2008; 22(10):3716-27.
11. Yamagishi S, Adachi H, Nakamura K, Matsui T, Jinnouchi Y, Takenaka K, et al. Positive association between serum levels of advanced glycation end products and the soluble form of receptor for advanced glycation end products in nondiabetic subjects. *Metabolism*. 2006;55(9):1227-31.