

**INSTITUTO NACIONAL DE ENSINO SUPERIOR E PESQUISA**

**CENTRO DE CAPACITAÇÃO EDUCACIONAL**

**MARILENE LEITE ALVES**

**GLOBULOS VERMELHOS NUCLEADOS (NRBC) E SEPSE EM  
PACIENTES DE UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA (UTI)**

**RECIFE**

**2016**

**MARILENE LEITE ALVES**

**GLOBULOS VERMELHOS NUCLEADOS (NRBC) E SEPSE EM  
PACIENTES DE UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA (UTI)**

Monografia apresentada ao Instituto Nacional de Ensino Superior e Pesquisa e Centro de Capacitação Educacional, como exigência do Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* em Hematologia e Hemoterapia Laboratorial.

Orientadora: Profa. Dra. Dilênia de Oliveira  
Cipriano Torres

Co-orientadora: Profa. Dra. Karla Melo  
Ferreira da Silva

**RECIFE-PE**

**2016**

**A474g**     **Alves, Marilene Leite**

Globulos Vermelhos Nucleados (NRBC) e Seps  
em Pacientes de Unidade de Terapia Intensiva (UTI)/  
Marilene Leite Alves.- Recife: Ao Autor, 2016.

52p:il.

ISBN

1. Glóbulos vermelhos nucleados. 2. Unidade de  
terapia intensiva. 3. Mortalidade. 4. Seps. I. Alves,  
Marilene Leite. II Título

**CDD 576.84**

**MARILENE LEITE ALVES**

**GLOBULOS VERMELHOS NUCLEADOS (NRBC) E SEPSE EM  
PACIENTES DE UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA (UTI)**

Monografia para obtenção do grau de Especialista em Hematologia e Hemoterapia Laboratorial.

Recife(PE), 31 de Dezembro de 2016.

**EXAMINADOR:**

Nome:

Titulação:

**PARECER FINAL:**

## DEDICATÓRIA

A minha mãe (Maria Leite de Sá), pelo amor e gratidão.

As minhas amigas (Maria Sheyla Marinho Falcão e Larissa Marinho), pelo exemplo e incentivo de todos os dias.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha Orientadora, Professora Dilênia Cipriano pelo tempo e dedicação disponibilizados para me auxiliar na realização desta Monografia, assim como a Professora Karla Melo, minha co-orientadora, pois foram muito importantes para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

A minha mãe exemplos de vida e dedicação. Graças à Maria Leite de Sá, pude chegar aonde cheguei e conquistar o que conquistei. A você, meu AMOR, CARINHO, RESPEITO e GRATIDÃO.

Agradeço também a todas as outras pessoas presentes durante o meu percurso acadêmico neste ciclo de estudos, desde Professores a colegas.

E por fim, um agradecimento especial aos meus amigos, esposo e família que me incentivaram e apoiaram para concluir mais uma etapa da minha formação.

## RESUMO

A Sepsé é a principal causa de morte em pacientes tratados em unidade de terapia intensiva (UTI). Mesmo com os avanços sobre o melhor entendimento de sua fisiopatologia e da aplicação de novos recursos terapêuticos, a taxa de mortalidade permanece elevada. A presença de glóbulos vermelhos nucleados (NRBCs), na circulação periférica é um biomarcador independente de pior prognóstico em pacientes enfermos. O objetivo deste estudo foi avaliar os NRBCs sanguíneos como preditor de mortalidade em paciente de (UTI). O estudo foi do tipo coorte prospectivo, a detecção de NRBCs foi usada para um monitoramento diário de 152 pacientes de UTI. Calculado o risco relativo de mortalidade entre as variáveis clínicas e laboratoriais, com os respectivos intervalos de confiança de 95%. Os NRBC foram medidos diariamente em pacientes com Insuficiência cardíaca consecutiva (ICU), incluindo indivíduos tanto cardíacos agudos coronarianos como não-coronarianos. Os escores prognósticos (APACHE II e SOFA) foram correlacionados em pacientes diagnosticados com sepsé na UTI. A incidência de NRBCs na UTI foi de 54,6% (83/152). A mortalidade na UTI quanto hospitalar foi maior entre os pacientes com NRBC-positivo (49,4% e 61,4%), em comparação aos pacientes NRBC-negativo (21,7 e 33,3%), respectivamente ( $p < 0,001$ ). Após análise multivariada, o paciente ser coronariano, entre os fatores clínicos, não teve associação com o óbito, mas teve significância estatística com os pacientes sépticos. A presença de eritroblasto sérico teve associação com os escores APACHE II ( $\geq 25$ ) e SOFA média ( $\geq 7$ ) ( $p < 0,001$ ). Foi observado que o NRBC + APACHE II apresentam juntos uma área sob a curva de 0,746 (74,67%). Neste estudo, podemos sugerir que a presença de NRBCs no sangue periférico é um preditor independente de mortalidade e em associação com o APACHE II apresenta o melhor modelo de risco de óbito.

**Palavras-chave:** Glóbulos vermelhos nucleados. Unidade de terapia intensiva. Mortalidade. Sepsé.

## ABSTRACT

Sepsis is the leading cause of death in patients treated in a unit of therapy Intensive care (ICU). Even with advances in the better understanding of its pathophysiology and the application of new therapeutic resources, the deferred mortality rate remains high. The presence of nucleated red blood cells (NRBCs) in the peripheral circulation is an independent biomarker of worse prognoses in diseased patients. The objective of this study was to evaluate the blood NRBCs as a predictor of mortality in an Intensive Care Unit. The study was a prospective cohort type, the detection of NRBCs was used for daily monitoring of 152 ICU patients. The relative risk of mortality was calculated between the clinical and laboratory variables, with the respective 95% confidence intervals. NRBCs were measured daily in patients with consecutive cardiac failure (ICU), including both coronary and non-coronary acute cardiac. The prognostic scores (APACHE II and SOFA) were correlated in patients diagnosed with sepsis in the ICU. The incidence of NRBCs in the ICU was 54.6% (83/152). In-hospital mortality was higher among NRBC-positive patients (49.4% and 61.4%), compared to NRBC-negative patients (21.7 and 33.3%), respectively ( $p < 0.001$ ). After multivariate analysis, the patient was coronary, among the clinical factors, had no association with death, but had statistical significance with the septic patients. The presence of serum erythroblast was associated with APACHE II ( $\geq 25$ ) and mean SOFA ( $\geq 7$ ) ( $p < 0.001$ ). It was observed that the NRBC + APACHE II together present an area under the curve of 0.746 (74.67%). In this study, we can suggest that the presence of NRBCs in peripheral blood is an independent predictor of mortality and in association with APACHE II presents the best model of death risk.

**Keywords:** Nucleated red blood cells; intensive care unit; mortality; Sepsis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Analisador automático de hemogramas <i>Sysmex XE-2100</i>	24
Figura 2. Classificação das Células Jovens	25
Figura 3. Esfregaço de sangue periférico com presença de eritroblastos	26
Figura 4. Mecanismo de ação no canal NRBC	29

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1.	16-17
Quadro 2.	17-18

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACCP	<i>American College of Chest Physican</i>
APACHE	<i>Acut Physiology And Chronic Health Evaluation</i>
BASES	<i>Brazilian Sepsis Epidemiological Study</i>
EUA	Estados Unidos da América
FiO <sub>2</sub>	Fração Inspirada de oxigênio
IL	Interleucina
INF	Interferon
ILAS	Instituto Latino Americano da Sepse
LPS	Lipopolissacarídeo
MO	Medula Óssea
MODS	<i>Multiple Organ Dysfunction Score</i>
NRBCs	Glóbulos vermelhos nucleados
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial media
PaO <sub>2</sub>	Pressão arterial de oxigênio
PAS	Pressão arterial sistêmica
pH	Potencial hidrogênico
PROCAPE	Pronto-socorro Cardiológico de Pernambuco
SAPS	<i>Simplified Acute Physiology Score</i>
SCCM	<i>Society of Critical Care Medicine</i>
SDMO	Síndrome da disfunção de múltiplos Órgãos
SIRIS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SOFA	<i>(Sepsis-related Organ Failure Assessment)</i>
TNF	Fator de necrose tecidual
TTP	Tempo de tromboplastina parcial
UTI	Unidades de Terapia Intensiva

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1 JUSTIFICATIVA.....	14
<b>2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
2.1 SEPSE.....	15
2.1.1 Considerações gerais e definições.....	15
2.1.2 Epidemiologia.....	17
2.1.3 Protogênese.....	19
2.2 MARCADORES DE PROGNÓSTICO.....	20
2.3 CITOCINAS ENVOLVIDAS NA SEPSE.....	21
2.4 HEMOGRAMA.....	22
2.4.1 Definições e Aplicações.....	22
2.5 GLÓBULOS VERMELHOS NUCLEARES.....	24
2.5.1 Aspectos clínicos gerais.....	24
2.5.2 Análise laboratorial de NRBC Eritroblastos.....	26
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
4.1 Sujeito e Protocolo.....	28
4.2 Testes laboratoriais.....	29
4.3 Análise estatística.....	30
<b>5.RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>6.CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXO 01.....</b>	<b>44</b>
<b>ANEXO 02.....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXO 03.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO 04.....</b>	<b>52</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A sepse é uma das situações nas quais se estabelece síndrome de resposta inflamatória sistêmica desencadeada por um processo infeccioso (Siqueira *et al.*, 2003). Estudos epidemiológicos brasileiros, realizado pelo Instituto Latino Americano da Sepse (ILAS), apontam que cerca de 17% dos leitos de Unidades de Terapia Intensiva (UTI) em nosso país são ocupados por pacientes com sepse grave; e a taxa de mortalidade chega a alcançar 55% dos pacientes que apresentam esse quadro nas UTIs brasileiras. Há importante heterogeneidade entre as instituições de saúde, podendo variar entre 30% e 70% (ILAS, 2015) o índice de pacientes atingidos.

No Brasil, aspectos epidemiológicos da sepse têm sido investigados, destacando-se *Brazilian Sepsis Epidemiological Study* (BASES) realizado em cinco unidades de terapia intensiva do sudeste e sul do país na qual se identificou uma incidência de sepse e sepse grave de 61,4 e 35,6 por 1000 pacientes dia (SILVA *et al.*, 2004).

A sepse resulta de uma maneira complexa interação entre microrganismo infectante e a resposta imune, pró-inflamatória e pró-coagulante do hospedeiro, onde a resposta ao infectado e as características do organismo infectante são as principais variáveis fisiopatológicas da sepse (RUSSEL, 2006). Dessa maneira, a sepse pode ser autolimitada ou progredir para sepse grave e choque séptico, em que levam a alterações circulatórias como vasodilatação periférica, oferta inadequada de oxigênio aos tecidos devido à queda do fluxo sanguíneo e da redução do débito cardíaco contribuindo para o aumento do metabolismo. E a hipóxia tecidual reflete a gravidade da doença que leva a disfunção de órgãos (SILVA *et al.*, 2004).

Alguns estudos têm afirmado que a hipoxemia e/ou infecção graves são responsáveis pela presença de glóbulos vermelhos nucleados (NRBCs), quando afastado doenças hematológicas, câncer, insuficiência cardíaca congestiva, anemias agudas e crônicas (STACHON *et al.*; 2007, DESAI *et al.*; 2012, KUERT *et al.*; 2011). Pacientes com NRBCs positivo têm concentrações elevadas de eritropoietina, interleucina-3 e interleucina-6 sugestivo de um papel importante de diminuição tissular de oxigenação e/ou inflamação, causadas por desordens locais ou sistêmicas (KUERT *et al.*; 2011).

Por longo tempo, a contagem dos eritroblastos era somente determinada microscopicamente, limitando o número de células contadas e a variabilidade na dependência da habilidade individual, comprometendo a acurácia e precisão do método. Com o surgimento da contagem automatizada, análise mecânica sanguínea devido ao avanço tecnológico, foi possível analisar concentrações de eritroblastos menores de 100/ $\mu$ l com confiabilidade metodológica (SCHAEFER *et al.*; 2000, PIPITONE *et al.*, 2012). A contagem automatizada dos eritroblastos surgida há mais de uma década e as pesquisas do grupo de Axel Stachon, com publicações na literatura a partir de 2004 com pacientes críticos em unidades de terapia intensiva, despertou na comunidade científica a importância da contagem sérica dos eritroblastos como um biomarcador de pior prognóstico (STACHON *et al.*; 2007).

Em estudo anterior, realizado por nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que a detecção sérica de NRBC tem uma forte associação com a mortalidade hospitalar (MONTEIRO JUNIOR; 2014). Pesquisas com biomarcadores sanguíneos têm oferecido oportunidade de medições não invasivas, de baixo custo, reprodutivas e objetivas, sendo uma ferramenta chave de prognóstico independente em pacientes críticos (CHONGLIANG *et al.*; 2013). Encontrar um biomarcador confiável para morbimortalidade é um desafio na prática diária na UTI. Assim, o objetivo do nosso estudo foi avaliar diariamente os níveis de NRBCs sanguíneos e associá-los como marcador de mortalidade em pacientes em uma UTI cardiológica.

### 1.1 JUSTIFICATIVA

A sepse continua sendo um dos maiores desafios para a medicina intensiva. Apesar do melhor entendimento de sua fisiopatologia e da aplicação de novos recursos terapêuticos a taxa de mortalidade permanece elevada. A presença de NRBC no sangue periférico em adultos e crianças e a contagem elevada em recém-nascidos podem estar associada a um prognóstico ruim. As dificuldades na definição e no diagnóstico fez com que nosso grupo de pesquisas tenha sido investido na tentativa de encontrar um biomarcador confiável para morbimortalidade na prática diária na UTI, como também indicar a gravidade e o prognóstico dos pacientes de maneira não invasiva, de baixo custo, reprodutivas e objetivas, sendo uma ferramenta chave de prognósticos independente em pacientes críticos.

Portanto, este trabalho foi realizado com base em artigo publicado pelo nosso grupo de pesquisa do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco- PROCAPE (em

anexo), em pacientes cardiopatas, comparado com escores clínicos existentes APACHE II e SOFA, que são rotineiramente utilizados na UTI.

## 2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 SEPSE

#### 2.1.1 Considerações gerais e definições

As variedades e conceitos de sepse foram definidos em 1991 pela Sociedade de Terapia Intensiva Americana, onde a identificação do quadro real era imprecisa, o que dificultava o correto diagnóstico e a instauração de uma terapia precoce (*American College of Chest Physicians – ACCP e a Society of Critical Care Medicine SCCM*) (Quadro 1).

**Quadro 1.** Definição dos estágios da sepse.

**Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRIS):** resposta inflamatória sistêmica a uma variedade de insultos clínicos graves, como queimaduras e pancreatite, que ocorre, necessariamente, na ausência de infecção. Acompanhada por duas ou mais das seguintes condições:

- Temperatura  $>38^{\circ}\text{C}$  ou  $< 36^{\circ}\text{C}$
- Frequência cardíaca  $> 90$  batimentos/min.
- Frequência respiratória  $>20$  movimentos/min. Ou  $\text{PaCO}_2 < 32$  torr ( $<4,3$  KPa)
- Leucócitos  $<4.000$  ou  $>12.000$  células/mm<sup>3</sup> ou  $> 10\%$  formas imaturas

**Infecção:** Fenômeno microbiano caracterizado por uma resposta inflamatória reacional à presença de microrganismo ou à invasão de tecido normalmente estéril àqueles organismos.

**Sepse:** É a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica decorrente de infecção mesmo que o foco infeccioso seja apenas suspeito.

**Sepse Grave:** É decorrente de resposta inflamatória generalizada e pró-coagulante a uma infecção difusa, o resultado final pode ser a lesão endovascular difusa, comprometimento de múltiplos órgãos e óbito.

**Choque Séptico:** Estado de falência circulatória aguda caracterizada pela persistência de hipotensão arterial, sendo hipotensão definida como PA (pressão arterial) sistólica < 90 mmHg ou redução de > 40 mmHg da linha de base, ou PAM (pressão arterial média) < 60 mmHg, a despeito de adequada reposição volêmica, na ausência de outras causas de hipotensão.

**Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO):** Está relacionada com a presença de inflamação, em pacientes com doença aguda, de forma que a homeostase não pode ser mantida sem intervenção; é considerado um processo resultante da resposta inflamatória sistêmica ao trauma, isquemia ou a processo infeccioso.

Termos como infecção bacteremia, SIRIS (síndrome de resposta inflamatória sistêmica), sepse, sepse grave, choque séptico e síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO) foram analisados e regulamentados através de médicos e pesquisadores, no entanto, sepse, do grego *sepsin* (putrefação de matérias ou tecidos orgânicos) é definida como um processo infeccioso em foco grave desencadeado de uma resposta inflamatória sistêmica secundária (BROOMER, 2011; HOTCHKISS *et al.*, 2013). As manifestações clínicas e os critérios para diagnóstico estão representados no Quadro 2.

**Quadro 2.** Critérios de diagnóstico de sepse após infecção documentada ou suspeita

---

Variáveis gerais

---

- Febre (temperatura central > 38,3°C)
- Hipotermia (temperatura central < 36°C)
- Frequência cardíaca > 90 bpm ou mais de 2 desvios-padrões acima do normal
- Taquipnéia
- Alterações sensoriais
- Edema significativo ou balanço hídrico positivo
- Hiperglicemia na ausência de diabetes

---

### Variáveis inflamatórias

---

- Leucocitose: contagens de leucócitos totais > 12.000 células/mm<sup>3</sup> de sangue
- Leucopenia: contagens de leucócitos totais < 4.000 células/mm<sup>3</sup> de sangue
- Contagens de leucócitos normais com mais de 10% de células imaturas
- Proteína C reativa no plasma > 2 desvios-padrões acima do valor normal
- Procalcitoninas plasmáticas > 2 desvios-padrões acima do valor normal

---

### Variáveis hemodinâmicas

---

- Hipotensão arterial (PAS<90mmHg, PAM< 70mmHg, ou redução da PAS>40mmHg em adolescentes, ou PAS /PAM <2 desvios-padrões abaixo do valor normal para a idade)
- Saturação de oxigênio venoso misto > 70% (não válido para crianças)
- Índice cardíaco > 3,5l/min (não válido para crianças)

---

### Variáveis de disfunção de órgãos

---

- Hipoxemia arterial (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>< 300 sem pneumonia)
- Oligúria aguda (diurese < 0,5 ml/Kg hora)
- Creatinina com aumento > 0,5 mg/dl
- Alterações de coagulação (RNI >1,5 ou TTP>60s)
- Trombocitopenia (contagens de plaquetas < 100.000/mm<sup>3</sup> sangue)
- Hiperbilirrubinemia(bilirrubina total>4mg/dL)

---

### Variáveis de perfusão tecidual

---

- Hiperlactatemia(>mmol/L)
- Enchimento Capilar ou moteamento

BPM: batimentos por minutos; PAS:pressão arterial sistólica; PAM: pressão arterial média; PaO<sub>2</sub>: pressão parcial de oxigênio; FiO<sub>2</sub>: fração inspirada de oxigênio; RNI: razão normatizada internacional; TTP: tempo de tromboplastina parcial (*Adaptada de LEVI, 2003*).

## 2.1.2 Epidemiologia

A sepse é uma das doenças mais desafiadoras da medicina, onde têm sido despendidos esforços para um melhor entendimento da inflamação sistêmica que caracteriza essa síndrome, considerada como a principal causa de morte nas UTIs e uma das principais causas de morte em geral nos EUA. A sepse é caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica secundária a um processo infeccioso em foco

presumido ou conhecido e quando não tratada corretamente, pode evoluir para choque séptico, resultando em falência de órgãos e conseqüentemente, em óbito (ANGUS *et al.*; BILEVINICIUS *et al.*, 2001; (VICENT,2013).

Nos EUA, no período entre 1979 e 2000, a incidência de sepse aumentou de 82, 7 para 240,4 casos a cada 100.000 indivíduos. De acordo com esse estudo, nesse período ocorreram 10.319.418 casos de sepse, sendo mais comum entre homens do que mulheres (MARTIN, 2003). Apesar da mortalidade por sepse ter diminuído de 27,8% para 17,9% em 22 anos nos EUA, cerca de 250.000 casos de sepse ainda levam a mortes nos EUA anualmente (GAIESKI, 2013).

Um estudo multicêntrico do qual fizeram parte sete unidades de tratamento intensivo (UTIs) nacionais revelou que as taxas de letalidade nas UTIs no Brasil foram maiores (56%) que aquelas de outros países em desenvolvimento (45%) e de países desenvolvidos (30%), apesar de não existirem diferenças nas idades medianas de cada grupo, nem nos escores de prognóstico e de disfunção orgânica (PROGRESS, 2003).

O primeiro estudo brasileiro de grande porte abordado a este tem foi o *Brazilian Sepsis Epidemiological Study* (BASES), em 2004, traçou o perfil de paciente admitidos nas UTIs das regiões Sul e Sudeste com a finalidade de determinar a incidência de sepse nesses pacientes, em que foi observada uma incidência de 30,5% de pacientes internados com sepse e foi estabelecido que a diferença da taxa de sobrevivência entre os pacientes sépticos e não sépticos após de 28 dias de internação foi de 66% e 88%, respectivamente (SILVA *et al.*, 2004).

No Brasil, os dados sobre sepse ainda são pouco documentados, devido à consolidação reduzida das informações por diversos hospitais, dificultando o conhecimento da extensão do problema no país, o que colabora para que os pacientes com sepse apresentem piores desfechos clínicos, tais como o aumento da mortalidade do tempo de internação hospitalar, além de piores parâmetros vitais e laboratoriais (HISSA; ARAUJO, 2013).

### 2.1.3 Patogênese

A sepse é resultado de um desbalanceamento hemodinâmico frente a agentes infecciosos e mediadores inflamatórios na circulação sanguínea, gerando alterações no fluxo sanguíneo e na microcirculação (JEAN-BAPTISTE, 2007).O desenvolvimento da sepse depende das relações estabelecidas entre o

microrganismo e o hospedeiro, destacando-se que muitos dos elementos relativos ao desencadeamento desta entidade nosológica permanecem obscuros, provavelmente pela falta de uma compreensão mais adequada das interseções entre imunidade, inflamação e coagulação (Siqueira-Batista et al., 2009).

Os sintomas da resposta inflamatória é decorrente da resposta imune. No entanto, há uma complexa interação entre os processos inflamatórios, coagulante e fibrinolítico, que ocorre em resposta a infecção bacteriana. O início desses três processos simultaneamente desempenha papel fundamental na fisiopatologia da sepse e a continuidade destes pode desencadear disfunção endotelial e falência múltipla dos órgãos culminando, se não houver tratamento com óbito (KOURILSKY; TRUFFA-BACHI, 2001).

Os fatores responsáveis pelo desencadeamento da resposta inflamatória através da ativação celular são, principalmente, os componentes presentes na parede celular dos microorganismos, como o lipopolissacarídeo (LPS), presente em bactérias gram-negativas (endotoxinas). O LPS e as outras toxinas são liberados geralmente durante o processo de replicação bacteriana e/ou decorrente da sua morte, devido à lise da parede celular (STEARNS-KUROSAWA, 2011).

Atualmente, a função de alguns mediadores na patogênese da sepse já está esclarecida. Estes mediadores podem induzir alterações profundas na fisiologia normal da vasculatura e dos órgãos, e são responsáveis pela patogênese da sepse (OSCHUOWSKI *et al.*, 2006). A interação entre os vários mediadores produzidos leva depressão do miocárdio, distúrbios vasculares e alterações em órgãos-alvo, como fígado, rins, pulmões e sistema nervoso central. O Resultado da resposta inflamatória descompensada é comprometimento hemodinâmico, levando a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (MODS), que é caracterizada por uma alta mortalidade (VENET, *et al.*, 2005).

## 2.2 MARCADORES DE PROGNÓSTICO

A avaliação da qualidade e da intensidade da resposta inflamatória pode levar a identificação de pacientes em risco de disfunção de órgãos (TAKALA et al., 2002). Um bom indicador para sepse deve fazer mais do que prever sobrevida dos pacientes, deve guiar o tratamento e revelar a sua resposta (MARSHALL et al.,

2003). Não existe um indicador isolado capaz de promover esta informação, o mais provável é que seja necessário um conjunto de indicadores de inflamação e imunossupressão (TAKALA et al., 2002).

Na prática, existem várias ferramentas para avaliar a gravidade do processo patológico e a ocorrência de disfunção orgânicas. Esses instrumentos utilizam marcadores fisiológicos e laboratoriais, e de maneira decisiva são utilizados para tomada de decisões clínicas, estratificando melhor os pacientes sob risco de evolução ruim, e uniformizando-os para comparações entre estudos clínicos (MARSHALL, 1999).

A escala de APACHE II (*AcutPhysiologyAndChronic Health Evaluation*) (ANEXO1) determina a gravidade da doença através da pior medida de 12 variáveis fisiológicas durante as primeiras 24 horas após a admissão na UTI, levando-se em conta as co-morbidades prévias e idade. Este escore inclui os seguintes fatores de risco: temperatura corporal, pressão arterial, média, frequência cardíaca, frequência respiratória, oxigenação sanguínea, pH arterial, sódio, potássio, creatinina, hematócrito, contagem de células brancas sanguíneas, escala de coma de Glasgow, idade e dados relativos à anamnese de insuficiência orgânica severa ou estado imunocomprometido de saúde. Esta é, sem dúvida, a escala prognóstica mais utilizada no contexto clínico, está validade como preditor de mortalidade em várias situações clínicas (KNAUS et al., 1985; ARRAES et al.; 2006; BOZZA et al., 2010)

O SOFA é um sistema de pontuação para a extensão da disfunção de órgãos ou sua

taxa de falha de forma individual em pacientes com sepse. Ele é baseado em uma escala de pontuação ou escores na qual a pontuação é baseada em seis pontos diferentes, cada um avaliando as disfunções dos diferentes sistemas como o respiratório, cardiovascular, hepático, a coagulação, os sistemas renal e neurológico (ANEXO 2) (DIAS et al.; 2006; BUENO et al., 2005).

### 2.3 CITOCINAS ENVOLVIDAS NA SEPSE

A falha das respostas anti-inflamatórias, em pacientes com sepse, pode ser as alterações que ocorrem no processo infeccioso durante todo o tempo. Tem sido rotulado que durante a sepse, a resposta imunológica ocorre devido a uma interação entre dois fenômenos inflamatórios opostos. Inicialmente, a sepse é caracterizada

por produção em excesso de mediadores inflamatórios (*status* hiperinflamatório) que é, então, gradativamente suprimida pelo surgimento de uma resposta anti-inflamatória (*status* hipoinflamatório), a qual representa uma resposta inflamatória (KUMAR et al., 2011).

Estudos mostraram que a resposta inflamatória é dinâmica e que as citocinas não apresentam um comportamento linear e constante, estando presentes tanto citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6), como de citocinas anti-inflamatórias, por exemplo, a IL-10, na fase inicial da sepse (OSUCHOWSKI *et al.*, 2006). O estímulo anti-inflamatório fisiológico é o responsável pela sobrevivência do paciente já que irá propiciar um equilíbrio destes mediadores. Porém, caso haja um desequilíbrio destes mediadores, a sepse inicial pode evoluir para choque, falência múltipla dos órgãos e óbito (SCHULTE; BERNHAGEN; BUCALA, 2013).

O estado hiperinflamatório pode conduzir o paciente à vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, hipotensão, choque, falência múltipla de órgãos e morte. No entanto, a resposta anti-inflamatória excessiva resulta na supressão da resposta imune (CHOUTEN, 2008). A Sepse induz também a produção e elevação dos níveis de citocinas anti-inflamatórias específicas. A IL-10 é produzida por macrófagos e células dendríticas e está relacionada com o controle, como exemplo clássico de *feedback* negativo, pois inibe a própria célula que a sintetiza. Atua ainda inibindo outras citocinas, como a IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-12, IFN $\gamma$  e TNF (VAN DER POLL; OPAL, 2008).

A elevação do nível sérico de IL-10 tem sido relacionada com o pior prognóstico na sepse, sugerindo que a superprodução pode ser um indicador de óbito e desta maneira, o equilíbrio entre o efeito pró e anti-inflamatório determina a manutenção da homeostase, preservando a função vital do organismo (WARD, 2011).

## 2.4 HEMOGRAMA

### 2.4.1 Definições e aplicações

O hemograma é um exame laboratorial que quantifica e avalia morfológicamente as células do sangue periférico permitindo conclusões diagnósticas e prognósticas de grande número de patologias. Entre todos os

exames laboratoriais atualmente solicitados por médicos de todas as especialidades, o hemograma é o mais requerido. Por essa razão reveste-se de grande importância no conjunto de dados que devem ser considerados para o diagnóstico médico, não se admitindo erros ou conclusões duvidosas (NAOUM FA, 2006).

A contagem das células do sangue se modernizou nas últimas décadas com a sofisticação tecnológica laboratorialoferecem sensibilidade, agilidade e precisão na realização desses hemogramas. Exames como hemoglobina/hematócrito (Hb/Ht) ,eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas foram substituídos pelo hemograma completo automatizado com contagem diferencial de leucócitos em cinco tipos – neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos, sendo realizado em menos de 1 minuto em analisadores hematológicos automatizados. As bancadas se convertem em estações de análise: esteiras, analisadores hematológicos e máquinas que confeccionam e coram lâminas (NASCIMENTO, 2005)

Outras metodologias, além da impedância elétrica, se somam com as análises mais complexas, como colorações citoquímicas especiais, análise celular pela condutividade e dispersão do laser e, mais recentemente, com o uso de fluorocromos, como corantes celulares e conjugados de anticorpos monoclonais, viabilizando a imunofenotipagem (NAOUM FA, 2006).

A análise automatizada permite a detecção de células anormais por meio de alertas (*flags*) para presença de neutrófilos jovens do “desvio à esquerda”, linfócitos atípicos reacionais, eritroblastos circulantes e blastos, onde as vantagens na contagem diferencial de células por analisadores hematológicos automatizados incluem diminuição do tempo de liberação, maior precisão com diminuição do coeficiente de variação, melhor reprodutibilidade, maior produtividade, e, após o desenvolvimento tecnológico desses equipamentos aprimorando os tipos de alertas que sugerem revisão de lâmina de esfregaço de sangue, tem ocorrido uma melhora na qualidade total dos exames liberados(NYDIA, 2009).



Figura 1 - Analisador automático de hemogramas Sysmex XE-2100.

Sistema hematológico automatizado, com correlação com a contagem microscópica 97 a 99% nos estudos.

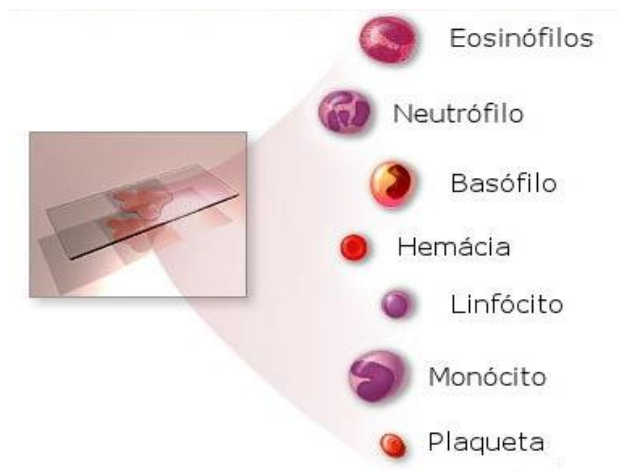


Figura 2. Esquema representativo das diferentes etapas das células hematológicas.  
Adaptado: <https://www.google.com.br/search?q=celulas>

A presença no sangue periférico de células jovens, ou seja, diferente das seis apresentadas, é um indicativo de alteração, podendo esta alteração ser fisiológica ou não. Algumas infecções severas, gestação, anemias, leucemias, etc. são alguns casos em que podemos encontrar células jovens no sangue periférico. A contagem diferencial dos leucócitos é representada em porcentagem e em valores absolutos. Os valores absolutos são apenas calculados com base na porcentagem dos leucócitos presentes com a contagem global de leucócitos (STACHON *et al.*; 2007).

A contagem de eritroblastos e sua subtração do total de leucócitos permitem uma contagem verdadeira de leucócitos na amostra. Um dos equipamentos que utilizam esse sistema são AbbottCellDyn 4000, Sysmex XE2100 e o Beckman-Coulter LH750 (NYDIA, 2009).

## 2.5 GLOBULOS VERMELHOS NUCLEADOS (NRBC)

### 2.5.1 Aspectos clínicos gerais

Os eritroblastos são células precursoras dos RBC e, excetuando o período neonatal, são normalmente encontradas somente na Medula Óssea (MO). A sua presença no sangue periférico não é normal e é o reflexo de um aumento extremo da atividade eritropoiética, habitualmente com eritropoiese extra-medular, ou resultado de lesão da MO como sucede em episódios hemolíticos agudos e de stress hipóxico severo, ou como resultado de uma doença maligna hematológica, incluindo muitas leucemias e síndromes mielodisplásicas, bem como alguns tipos de linfoma (SABRY *et al.*; 2012).

Os eritrócitos nucleados (figura 3) podem também estar presentes em caso de síndromes talassémicas, metástases de tumores sólidos na medula óssea, hematopoiese extracelular e outras patologias que envolvam stress hematopoiético, tais como sépsis, ou hemorragias massivas e nestas situações, a sua presença correlaciona-se com a severidade da doença. Observou-se que a entidade e duração da presença de eritrócitos nucleados no sangue periférico se encontram associada a maus prognósticos em várias doenças hematológicas e não hematológicas (BRIGGS, 2009).

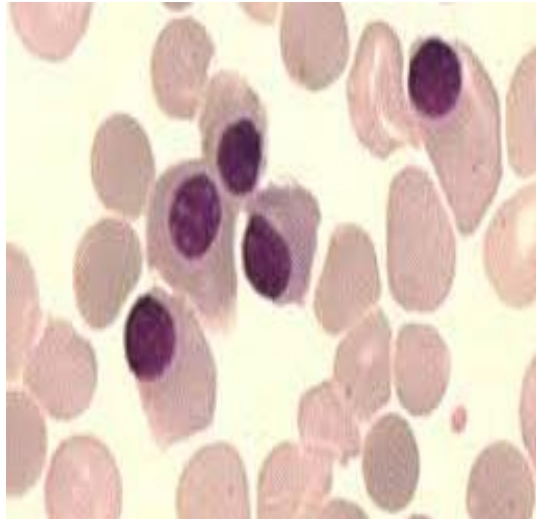


Figura 3 – Esfregaço de sangue periférico com presença de eritroblastos. Adaptado de: [http://www.farmacia.ufmg.br/ACT/Imagens%20Hematologia\\_arquivos/error.htm](http://www.farmacia.ufmg.br/ACT/Imagens%20Hematologia_arquivos/error.htm)

A presença de NRBC no sangue periférico em adultos e crianças e a contagem elevada em recém-nascidos podem estar associada a um prognóstico. No adulto, a eritropoiese ocorre somente na medula óssea e envolve uma complexa interação de células progenitora e precursora, citocinas, fatores de crescimento e um microambiente estromal (FERNADES, 2002). Stachon e col. (2005) em seu estudo revelaram que a detecção de NRBC em sangue periférico está associada ao aumento da eritropoietina, Interleucina-3 (IL-3) e Interleucina-6 (IL-6), mostrando um marcador para lesões hipóxicase inflamatórias. Estes autores concluíram que NRBCs positivo está relacionado com o risco de morte e o aumento de reticulócitos nestes pacientes mostra que a medula óssea não é afetada nestas condições.

Em adultos saudáveis, o valor da contagem automática de eritrócitos nucleados num analisador hematológico deve ser zero, em doentes cuja saúde não esteja em perfeitas condições, o benefício mais importante da contagem de eritrócitos nucleados é a exclusão de falsos positivos para valores elevados na contagem de leucócitos. Isto poderia conduzir a um diagnóstico e tratamento incorretos, em particular no caso de recém-nascidos com sépsis e contagens de leucócitos baixas (BRIGGS, 2009).

Stachon e col. (2007), em um estudo com 383 pacientes de Unidade de Terapia Intensiva (UTI), realizando o monitoramento diário de NRBCs, verificaram que a presença de NRBCs sanguíneo é de alto poder prognóstico com relação à mortalidade de pacientes criticamente enfermos. Nesse estudo, a incidência de

NRBCs elevou com o aumento da pontuação do *AcutPhysiologyAndChronic Health Evaluation II* (APACHE II), e do *SimplifiedAcutePhysiology Score II* (SAPSII), os autores concluíram que este parâmetro pode servir como um indicador diário de pacientes de alto risco de mortalidade, além disso, pacientes com NRBC positivos em UTI não devem ser transferidos para uma enfermaria normal, mas devem ter um tratamento de cuidados intensivos.

Sabry *et al.* (2012) em seu estudo concluíram que para pacientes com NRBC positivo ou agravamento da eosinopenia – um marcador de infecção, deve levantar a suspeita de uma deterioração patológica, então pacientes não devem ser transferidos para enfermaria, ainda que aparentemente saudáveis, a menos que investigados. Os autores observaram também que a pontuação do SAPS II não teve relação significativa com a eosinopenia, enquanto que para APACHE existiu uma relação significativa.

De acordo com Desai *et al.* (2012), ao realizar um estudo retrospectivo, com 275 pacientes com sepse cirúrgica, observou a presença de NRBC positivo em 48 pacientes (17,5%). Ao comparar com aqueles NRBC negativo, notou-se taxa de mortalidade tanto na unidade de terapia intensiva (UTI), (27% vs 12%,  $p = 0,007$ ), quanto naqueles que estavam no período de internação (35,4% vs 15%,  $p = 0,001$ ). Desta forma, espera-se encontrar através de uma revisão da literatura dados semelhantes. Além dos eritroblastos, outros testes feitos para biomarcadores estudam as características fenotípicas em células sanguíneas, do tecido endotelial e séricas, visando através destes a detecção e acompanhamento precoce, além da sequência de eventos celulares gerados em uma resposta imune e lesão tecidual, como ocorre nos casos de SIRS (Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica) e sepse.

### 2.5.2 Análise laboratorial de NRBC – Eritroblastos

Parte do volume aspirado da amostra de sangue é diluído e tratado com um reagente de lise celular (hemólise), realizado automaticamente pelo aparelho seletivamente remove as células vermelhas do sangue não-nucleadas e mantém a integridade de NRBCs, glóbulos brancos e plaquetas ou quaisquer detritos celulares que possam estar presentes na amostra preparada. Esta análise detalhada coleta

informações celulares que fornece: tamanho celular, características celulares internas, capacidade de dispersão de luz célula individual (Sysmex, 2010).

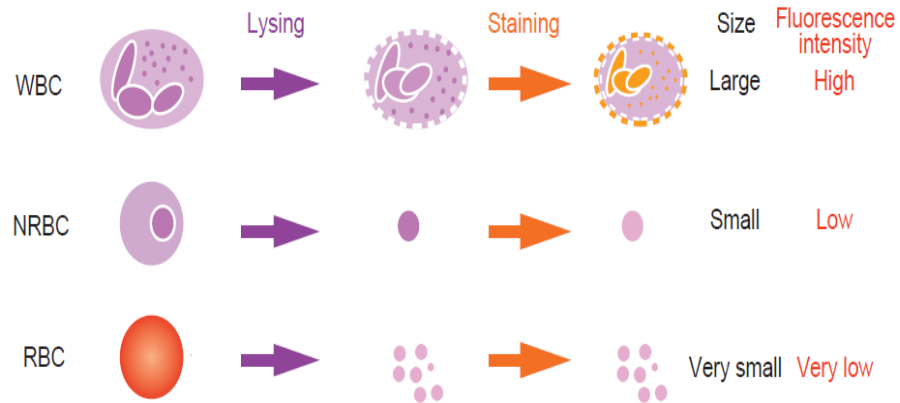


Figura 4 - Mecanismo de ação no canal NRBC.

Uma vez que os eritrócitos nucleados (NRBC) apresentam uma dimensão e núcleo semelhante aos linfócitos, muitos analisadores hematológicos podem classificar erradamente os NRBCs e produzir uma contagem total de leucócitos e linfócitos. Normalmente estas amostras são marcadas para análise microscópica, então é necessário proceder a contagem manual dos eritrócitos nucleados no esfregaço sanguíneo, para proceder à correção da contagem total de leucócitos e linfócitos (STOVE, 2009). Este é um procedimento caro, aborrecido e passível de erros. Além disso, caso a amostra não seja assinalada, a presença de eritrócitos nucleados pode permanecer indetectável originando uma contagem de leucócitos e linfócitos incorretamente elevada. Muitos acreditam ainda, que a contagem automatizada de eritrócitos nucleados não é mais do que uma forma de corrigir estas contagens. Contudo, o valor clínico da medição de eritrócitos nucleados ultrapassa largamente a correção da contagem de leucócitos e linfócitos (sysmex, 2010).

A contagem automatizada dos eritroblastos surgida há mais de uma década e as pesquisas do grupo de Axel Stachon, com publicações na literatura a partir de 2004 com pacientes críticos em unidades de terapia intensiva, despertou na comunidade científica a importância da contagem sérica dos eritroblastos como um biomarcador de pior prognóstico (STACHON *et al.*; 2007). Por longo tempo, a contagem dos eritroblastos era somente determinada microscopicamente, limitando

o número de células contadas e a variabilidade na dependência de habilidade individual, comprometendo a acurácia e precisão do método. Com o surgimento automação, análise mecânica sanguínea devido ao avanço tecnológico, foi possível analisar concentrações de eritroblastos menores de 100/ul com confiabilidade metodológica (PIPITONE *et al.*; 2010).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar os NRBCs sanguíneos como preditor de mortalidade em paciente de Unidade de Terapia Intensiva com Sepses.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar pacientes admitidos na UTI do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE);
- Classificar os pacientes coronarianos (agudo ou crônico), ou não coronariano (valvulopatias, perimiocardiopatias, arritmias cardíacas);
- Classificar pacientes em infectados (com sepse) e não infectados (sem sepse);
- Realizar a contagem de NRBCs, leucócitos, neutrófilos, hemoglobina, plaquetas e PCR;
- Avaliar o NRBC como preditor de mortalidade entre pacientes coronarianos e não-coronarianos na UTI;
- Correlacionar NRBCs com os Escores clínicos APACHE II e SOFA como preditor de mortalidade.

### **4. METODOLOGIA**

#### **4.1 Sujeito e protocolo**

Pacientes consecutivos admitidos na UTI do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE), um hospital cardiológico universitário de 250 leitos, da Universidade de Pernambuco, Recife, Brasil, de maio de 2013 a janeiro de 2014.

O significado prognóstico de NRBCs foi avaliado considerando os modelos de risco estabelecidos: o *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II* (APACHE II)

e o *Sequential OrganFailureAssesment* (SOFA). O APACHE II avalia a probabilidade de óbito, tendo como parâmetros os piores valores (12 variáveis fisiológicas e laboratoriais, mais a pontuação relacionada à idade, Escala de Coma de *Glasgow* e a presença de doença clínica ou cirúrgica) (9-11). O escore SOFA objetiva descrever e quantificar a disfunção de órgãos num processo contínuo, sendo reproduzível diariamente à beira do leito, com variáveis simples e objetivas de seis sistemas orgânico (respiratório, hepático, cardiovascular, renal, neurológico e da coagulação), sendo excelente no acompanhamento dos pacientes (12-15). Após as primeiras 24 horas da admissão na UTI, os pacientes tiveram os escores prognósticos APACHE II e SOFA calculados. O escore SOFA também foi calculado no 2º e 3º dias de internação e, posteriormente, de 48/48 horas até a alta da UTI.

Os pacientes também foram classificados em infectados (com sepse) e não infectados (sem sepse) obedecendo aos critérios estabelecidos para síndrome da resposta inflamatória sistêmica e que, nos pacientes com sepse existe a presença de um foco infeccioso documentado ou presumido (uso de antibioticoterapia) (16). Os pacientes foram classificados ainda em coronarianos (agudo ou crônico) (17,18) ou não coronarianos (valvulopatias, perimiocardiopatias, arritmias cardíacas). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o número CAAE: 08412412.20000.5192 na Plataforma Brasil.

#### 4.2 Testes laboratoriais

As análises laboratoriais foram obtidas por punção venosa pela manhã, diariamente, até a alta da UTI. Parâmetros sanguíneos (NRBCs, leucócitos, neutrófilos, hemoglobina e plaquetas) foram medidos usando um analisador sanguíneo Sysmex XE-2100. A Proteína C reativa (PCR) foi medida usando o analisador Cobas Integra 400 – Roche.

#### 4.3 Análise estatística

Para comparação das variáveis categóricas, foi aplicado o teste do Qui quadrado ( $X^2$ ) de Pearson, com correção de Yates, ou teste exato de Fischer, ambos bicaudais. Na comparação de médias, para identificar a normalidade da distribuição, foi empregado o teste de Kolmogov-Smirnov, seguido do teste t de Student para as

variáveis de distribuição normal ou do teste não paramétrico de Mann-Whitney para as variáveis sem distribuição normal. Foi calculado o risco relativo de mortalidade entre as variáveis clínicas e laboratoriais, com os respectivos intervalos de confiança de 95%. Foi realizada análise multivariada com aplicação de um modelo de regressão logística para identificação dos preditores independentes de mortalidade. O nível de significância estatística adotado foi  $p < 0.05$ . Para as análises estatísticas, foi utilizado o programa Statistical Program for Social Sciences (SPSS), versão 10.0 para Windows.

## **5. RESULTADOS**

Os resultados constam no artigo “Nucleated Red Blood Cells as Predictors of All-Cause Mortality in Cardiac Intensive Care Unit Patients: A Prospective Cohort Study” na Revista *Plos One* em 29 de Dezembro de 2015.

RESEARCH ARTICLE

# Nucleated Red Blood Cells as Predictors of All-Cause Mortality in Cardiac Intensive Care Unit Patients: A Prospective Cohort Study

José Gildo de Moura Monteiro Júnior<sup>1\*</sup>, Dilênia de Oliveira Cipriano Torres<sup>2</sup>, Maria Cleide Freire Clementino da Silva<sup>2</sup>, Tadzia Maria de Brito Ramos<sup>2</sup>, Marilene Leite Alves<sup>2</sup>, Wellington Jorge Nunes Filho<sup>1</sup>, Edgar Paulo Damasceno<sup>1</sup>, Antônio Fernandes Brunet<sup>1</sup>, Márcio Sommer Bittencourt<sup>3</sup>, Rodrigo Pinto Pedrosa<sup>1</sup>, Dário Celestino Sobral Filho<sup>1</sup>

**1** Coronary Care Unit of PROCAPE (Pernambuco Cardiac Emergency Hospital), University of Pernambuco (UPE), Recife, Pernambuco, Brazil, **2** Laboratory of PROCAPE, University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, **3** Center for Clinical and Epidemiological Research, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil

\* [jgildojunior@uol.com.br](mailto:jgildojunior@uol.com.br)



## Abstract

### Background

The presence of nucleated red blood cells (NRBCs) in the peripheral blood of critically ill patients is associated with a poorer prognosis, though data on cardiovascular critical care patients is lacking. The aim of the present study was to assess the role of NRBCs as a predictor of intensive care unit (ICU) and in hospital all-cause mortality among cardiologic patients.

### Methods

NRBCs were measured daily in consecutive cardiac ICU patients, including individuals with both coronary and non-coronary acute cardiac care. We excluded patients younger than 18 years, with cancer or hematological disease, on glucocorticoid therapy, those that were readmitted after hospital discharge and patients who died in the first 24 hours after admission. We performed a multiple logistic analysis to identify independent predictors of mortality.

### Results

We included 152 patients (60.6 ± 16.8 years, 51.8% female, median ICU stay of 7 [4–11] days). The prevalence of NRBCs was 54.6% (83/152). The presence of NRBC was associated with a higher ICU mortality (49.4% vs 21.7%,  $P < 0.001$ ) as well as in-hospital mortality (61.4% vs 33.3%,  $p = 0.001$ ). NRBC were equally associated with mortality among coronary disease (64.71% vs 32.5% [OR 3.80; 95%CI: 1.45–10.0;  $p = 0.007$ ]) and non-coronary disease patients (61.45% vs 33.3% [OR 3.19; 95%CI: 1.63–6.21;  $p < 0.001$ ]). In a multivariable model, the inclusion of NRBC to the APACHE II score resulted in a significant improvement in the discrimination ( $p = 0.01$ ).

## OPEN ACCESS

**Citation:** Monteiro Júnior JGdM, Torres DdOC, da Silva MCFC, Ramos TMdB, Alves ML, Filho WJN, et al. (2015) Nucleated Red Blood Cells as Predictors of All-Cause Mortality in Cardiac Intensive Care Unit Patients: A Prospective Cohort Study. PLoS ONE 10 (12): e0144259. doi:10.1371/journal.pone.0144259

**Editor:** Sheila Alexander, University of Pittsburgh, UNITED STATES

**Received:** June 5, 2015

**Accepted:** November 16, 2015

**Published:** December 29, 2015

**Copyright:** © 2015 Monteiro Júnior et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** These authors have no support or funding to report.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Conclusions

NRBC are predictors of all-cause in-hospital mortality in patients admitted to a cardiac ICU. This predictive value is independent and complementary to the well validated APACHE II score.

## Introduction

In healthy adults, peripheral blood is usually free of nucleated red blood cells (NRBCs) [1,2]. However, those cells may occur in some diseases, such as cancer, congestive heart failure, acute and chronic anemia and other hematological disorders [3,4]. Their presence in the peripheral blood has been associated with hypoxemia or infection in critical patients, owing to the high concentrations of erythropoietin, interleukin-3 and interleukin-6 [1,3,5–8] caused by local or systemic disorders, suggesting a reduction in oxidation of the tissue and/or inflammation.

Prior studies have also demonstrated that those cells may have significant prognostic implications, as their presence may occur in the three weeks prior to death [1–3]. In particular, Stachon et al. have demonstrated that NRBCs are a prognostic indicator in the Intensive Care Unit (ICU) environment, as its presence is associated with a higher in hospital mortality and higher ICU readmission rates, particularly when NRBC persist in the peripheral blood even after patients are clinically stable [1]. Although this has been demonstrated for general ICU patients, no data on patients admitted in the ICU for acute cardiovascular diseases exist. In the present study, we tested the hypothesis that the presence of NRBC may predict ICU (primary end-point) and in hospital (secondary end-point) all-cause mortality among patients admitted to a cardiac ICU.

## Materials and Methods

### Subjects and Protocol

All consecutive patients admitted in the cardiovascular ICU of the Pernambuco Cardiac Emergency Unit (PROCAPE), a specialized tertiary care cardiovascular teaching hospital with 250 beds, between May 2013 and January 2014 were included in the present study. This ICU is devoted to treat clinical patients with cardiovascular diseases. The study was approved by the Research Ethics Committee in the HOSPITAL COMPLEX HUOC/PROCAPE under number CAAE: 08412412.20000.5192 (Brazil Platform). We excluded patients younger than 18 years, with cancer or hematological diseases, on glucocorticoid therapy, those that were readmitted after hospital discharge and patients who died in the first 24 hours after ICU admission. All patients included in the study signed a free and informed consent form.

The *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II* (APACHE II) and the *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) scores were calculated from all patients twenty-four hours after admission to ICU, as previously described [9,10].

In the first twenty-four hours of admission, the patients were also classified as septic or not, according to previous criteria [11]. At the same time, the patients were also classified according to the cardiovascular disease etiology as coronary (acute or chronic) [12,13] or non-coronary (valvulopathies, perimyocardiopathies, cardiac arrhythmias), according to clinical and laboratorial and echocardiographic parameters.

## Laboratory tests

Blood samples were obtained daily in the morning until discharge from ICU. Blood parameters (NRBCs, leukocytes, neutrophils, hemoglobin and platelets) were measured using a Sysmex XE-2100 blood analyzer [14,15]. C-reactive protein was measured using a Roche Cobas Integra 400 analyzer.

For the NRBC measurement, we used the highest value during ICU admission for each individual. For the binary analysis, a positive NRBC was defined as any value above zero at any time during admission.

## Statistical analysis

All continuous variables are expressed as means  $\pm$  standard deviation, or median and quartiles, as appropriate. Categorical variables are presented as absolute values and percents. Categorical variables were compared using two-tailed Pearson's chi-squared ( $X^2$ ) test with the Yates correlation or Fisher's exact test. The comparison of means, to establish the normality of the distribution, was carried out using the Kolmogorov-Smirnov test, followed by Student's *t* test for normal distribution variables or Mann-Whitney's non-parametric test for non-normal distribution variables. The relative mortality risk was calculated for clinical and laboratory variables, with confidence intervals of 95%. Logistic univariate regressions were performed to evaluate predictors of mortality analyzing gender, age, APACHE score, SOFA score, sepsis diagnosis, presence of coronary artery disease and laboratorial data (Table 1). A multivariate logistic regression model (forward) was carried out to identify independent predictors of mortality. Variables with  $P < 0.1$  on univariate analysis were entered into a multivariate analysis. Due to the highly skewed distribution of the NRBC, we chose to perform its analysis as a binary variable based on the presence or absence of NRBC in the peripheral blood. In order to evaluate the incremental value of NRBC beyond clinical predictor of mortality in the ICU, we constructed ROC curves and calculated the area under the curve for each model, and compared a model including only the APACHE II score with a model including the APACHE II score and the NRBCs. The level of statistical significance adopted was  $p < 0.05$ . Sample size was calculated to assess a mortality odds ratio between patients with and without NRBC of 5.2 according to previous study by Stachon et al [1], assuming an  $\alpha$ -error of 5% and a statistical power of 95%. The minimum sample size was 60 patients. Because many patients from our sample did not present sepsis criteria and NRBCs in peripheral blood, we decided to recruit more patients than previously calculated. Statistical analyses were conducted using the Statistical Program for Social Sciences (SPSS), version 10.0 for Windows.

## Results

The study initially screened 199 patients, of whom 47 were excluded as shown in Fig 1. There were no follow-up losses and the final sample comprised 152 patients (60.6  $\pm$  16.8 years, 51.8% female), with a median stay in ICU of 7 days (P25: 4; P75: 11) (Table 1). Approximately half of the sample presented NRBCs in the blood (83 patients; 54.6%) and the higher incidence of NRBC was noted after the ninth ICU day (Table 2). The presence of NRBCs was associated with older age, longer ICU stay, higher severity (SOFA and APACHE II) scores, sepsis and non-coronary cardiac etiology (Table 1). There was a negative correlation between levels of platelets and those of NRBCs ( $R = -0.25$ ;  $p = 0.03$ ). However, levels of C-reactive protein ( $R = 0.18$ ;  $p = 0.14$ ), leukocytes ( $R = 0.22$ ;  $p = 0.06$ ), neutrophils ( $R = 0.20$ ;  $p = 0.09$ ), and hemoglobin ( $R = -0.02$ ;  $p = 0.87$ ) were not associated with levels of NRBCs.

While the overall cardiovascular ICU mortality was 36.8% (56/152), increasing levels of NRBC were associated with a higher ICU mortality (Fig 2). Hospital mortality following

**Table 1. Biological and clinical characteristics of patients in intensive care according to NRBC status.**

Characteristics	All patients	NRBC-positive (n = 83)	NRBC-negative (n = 69)	p
<b>Sex</b>				
Male	67 (44.1%)	40 (48.2%)	27 (22.0%)	0.263
Female	85 (51.8%)	43 (51.8%)	42 (78.0%)	
<b>Age (in years)</b>	60.6 ± 16.8	63.0 ± 16.1	57.6 ± 17.4	0.049 <sup>†</sup>
<b>Skin color</b>				
White	59 (38.8%)	30 (36.1%)	29 (42.0%)	0.707
Mixed	67 (44.1%)	39 (47.0%)	28 (40.6%)	
Black	26 (17.1%)	14 (16.9%)	12 (17.4%)	
<b>Origin</b>				
Emergency	123 (80.9%)	65 (78.3%)	58 (84.1%)	0.568
Wards	22 (14.5%)	13 (15.7%)	9 (13.0%)	
CTRU	7 (4.6%)	5 (6.0%)	2 (2.9%)	
<b>Median duration of stay in ICU (in days)*</b>	7 (4; 11)	10 (5; 13)	4 (3; 7)	< 0.001 <sup>†</sup>
<b>Mortality</b>				
ICU	56 (36.8%)	41 (49.4%)	15 (21.7%)	< 0.001 <sup>†</sup>
Hospital	74 (48.7%)	51 (61.4%)	23 (33.3%)	0.001 <sup>†</sup>
<b>Median APACHE II*</b>	21 (14; 27.5)	25 (19; 33)	15 (11; 22)	< 0.001 <sup>†</sup>
<b>APACHE II</b>				
< 25 points	56 (36.8%)	39 (47.0%)	57 (82.6%)	< 0.001 <sup>†</sup>
≥ 25 points	96 (63.2%)	44 (53.0%)	12 (17.4%)	
<b>Median SOFA*</b>	5 (2; 9)	8 (4; 11)	3 (1; 7)	< 0.001 <sup>†</sup>
<b>SOFA score</b>				
< 7 points	86 (56.6%)	35 (42.2%)	51 (73.9%)	< 0.001 <sup>†</sup>
≥ 7 points	66 (43.4%)	48 (57.8%)	18 (26.1%)	
<b>SEPSIS</b>				
Yes	84 (55.3%)	59 (71.1%)	25 (36.2%)	< 0.001 <sup>†</sup>
No	68 (44.7%)	24 (28.9%)	44 (63.8%)	
<b>Coronary patient</b>				
Yes	74 (48.7%)	34 (41.0%)	40 (58.0%)	0.037 <sup>†</sup>
No	78 (51.3%)	49 (59.0%)	29 (42.0%)	
<b>Coronary/Sepsis</b>				
Sepsis and coronary	30 (19.7%)	19 (22.9%)	11 (15.9%)	< 0.001 <sup>†</sup>
Sepsis and non-coronary	54 (35.5%)	40 (48.2%)	14 (20.3%)	
No sepsis and coronary	44 (29.0%)	15 (18.1%)	29 (42.0%)	
No sepsis and non-coronary	24 (15.8%)	9 (10.8%)	15 (21.7%)	

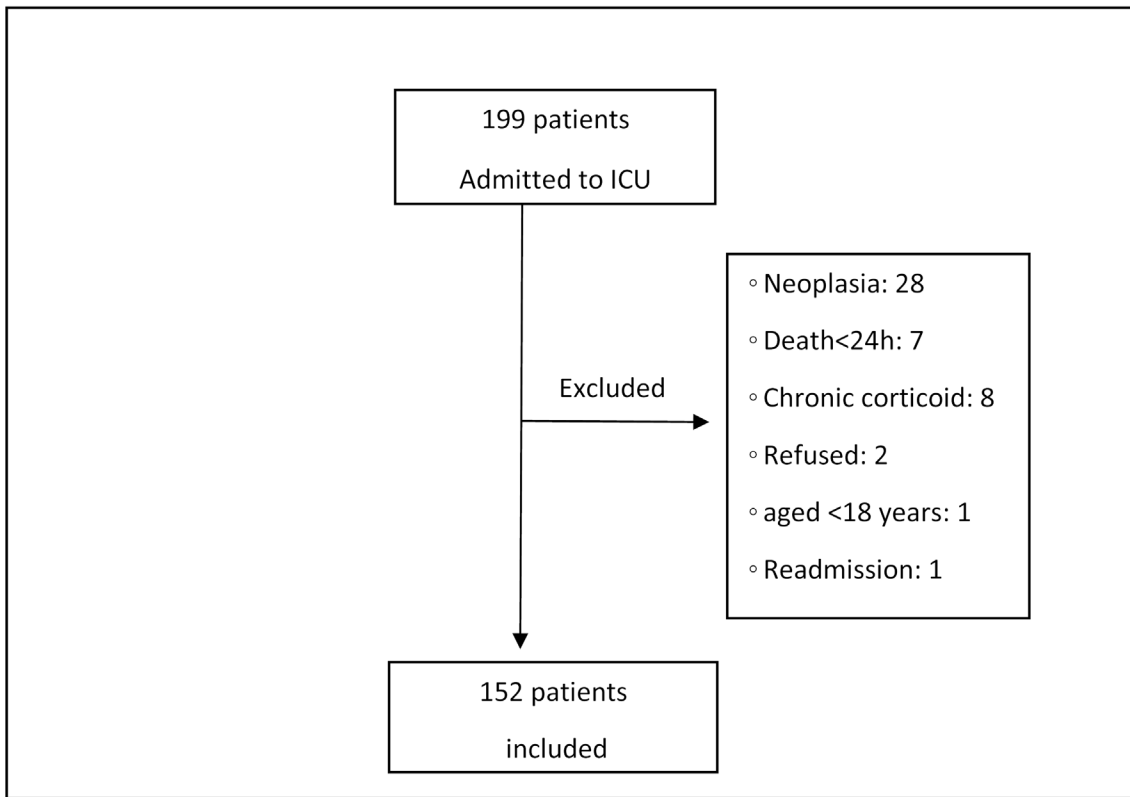
NRBCs: nucleated red blood cells APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II. SOFA: Sequential Organ Failure Assessment CTRU: Cardio-Thoracic Recovery Unit.

<sup>†</sup> Statistically significant association.

\*Median (P25; P75).

doi:10.1371/journal.pone.0144259.t001

discharge from ICU was 18.8% (18/96), with an in-hospital all-cause mortality of 48.7% (74/152). The presence of NRBC in the peripheral blood was associated with both ICU (49.4% vs. 21.7%,  $p < 0.001$ ) and in-hospital (61.4% vs. 33.3%,  $p = 0.001$ ) all-cause mortality rates, respectively (Table 1) and was also associated with increased mortality among patients with coronary disease with 64.7% vs. 32.5% (OR 3.80; 95%CI: 1.45–10.0;  $p = 0.006$ ), as well as among non-coronary disease patients with 59.2% vs 34.5% (OR 2.75; 95% CI: 1.06–7.15;  $p = 0.035$ ) (Fig 3).



**Fig 1. Flowchart of patients.**

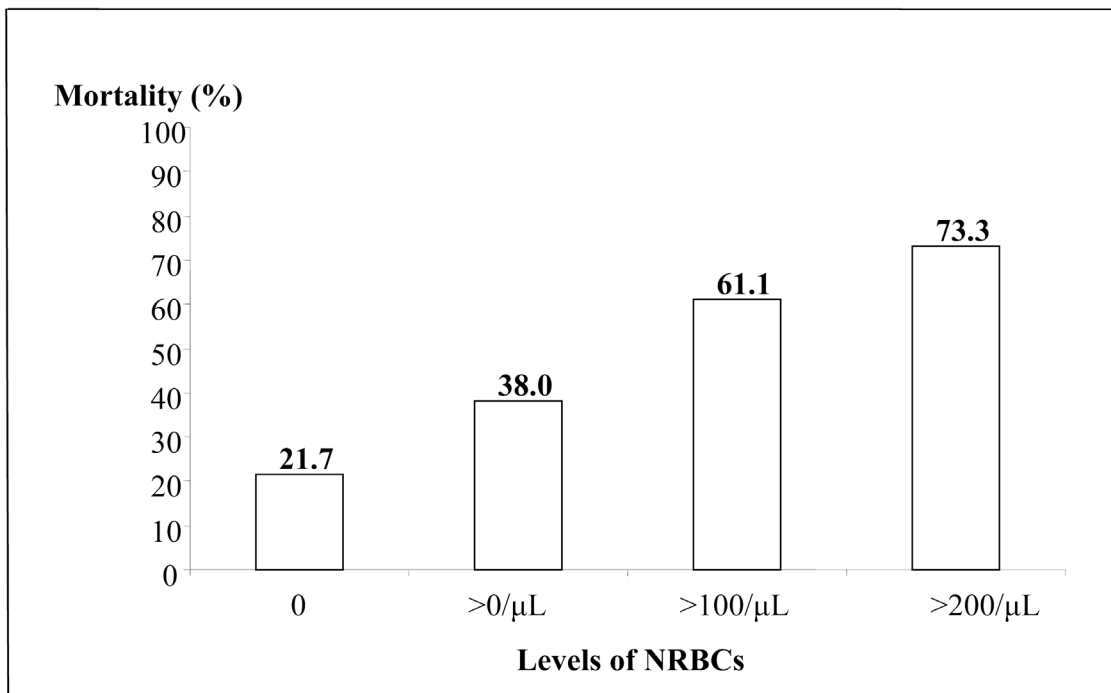
doi:10.1371/journal.pone.0144259.g001

**Table 2. Distribution of the measure of the maximum NRBC during the hospital stay in the ICU.**

NRBC	Statistics
Sample	152 patients
NRBC maximum rating	
Zero	69 (45.4%)
From 1 a 100	50 (32.9%)
From 101 a 200	18 (11.8%)
> 200	15 (9.9%)
Presence of NRBC per day of hospitalization	
1° day	34/152* (22.4%)
2° day	36/124 (29.0%)
3° day	30/110 (27.3%)
4° day	20/77 (25.9%)
5° day	24/84 (28.6%)
6° day	16/57 (28.1%)
7° day	15/67 (22.4%)
8° day	10/46 (21.7%)
9° day	17/44 (38.6%)
After 9° day	11/35 (31.4%)

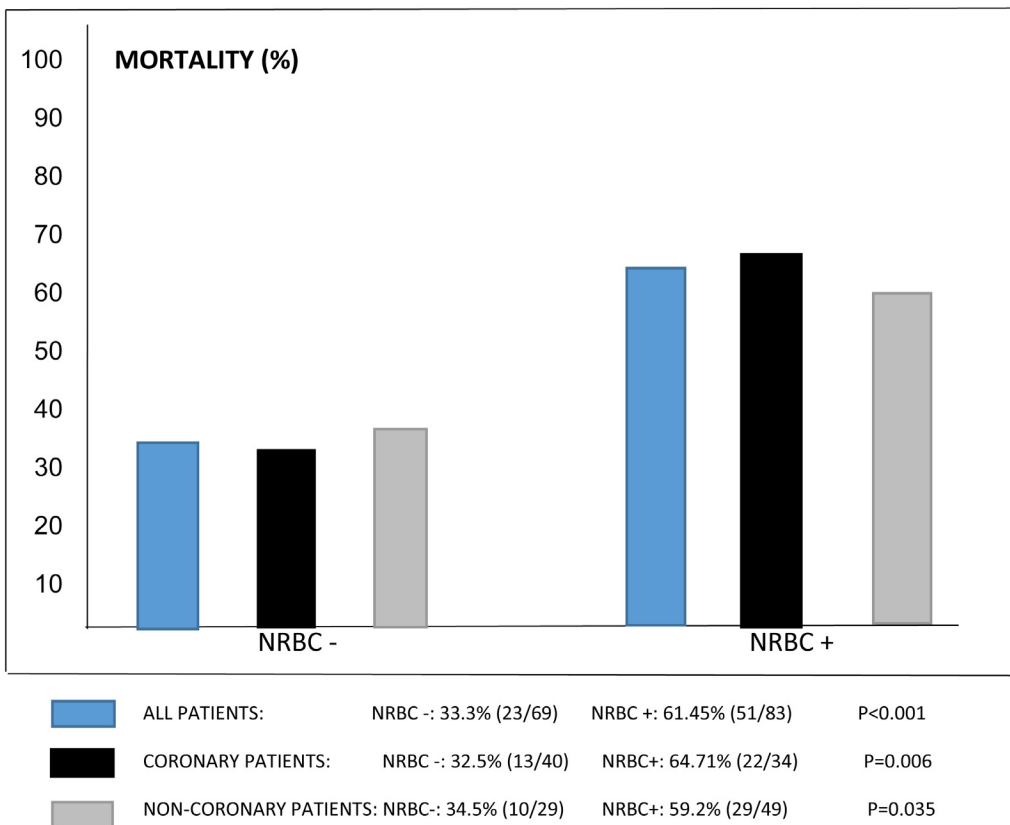
\* Number of patients with positive NRBC / Number of patients with measures NRBC.

doi:10.1371/journal.pone.0144259.t002



**Fig 2. Mortality of ICU patients in relation to concentrations of nucleated red blood cells (NRBCs) P<0.001.**

doi:10.1371/journal.pone.0144259.g002



**Fig 3. Mortality among coronary and non-coronary patients.**

doi:10.1371/journal.pone.0144259.g003

After adjustment, for the clinical mortality risk using the APACHE II score, sex and sepsis, NRBC remained associated with all-cause in hospital mortality (OR 3.96; 95% CI: 1.45–10.8;  $p = 0.007$ ) (Table 3). The inclusion of NRBC in a model already including the APACHE II score resulted in a significant increase in the area under the ROC curve from 0.7668 to 0.7929,  $p = 0.011$  (Fig 4).

### Discussion

In the present study, we have demonstrated that the presence and levels of NRBC in the peripheral blood are independent predictors of all-cause in-hospital mortality for patients admitted to a cardiac ICU. This association also resulted in an important improvement in the discrimination beyond the well-validated APACHE II score.

Our findings corroborate previous results in patients admitted to general ICUs, suggesting that NRBCs are equally predictive of events in both the cardiac and non cardiac population [1–7]. In this population, coronary pathologies were not found to be associated with mortality (OR 0.90;  $p = 0.739$ ) and the presence NRBCs, as in general ICUs, was the best indicator of

**Table 3. Univariable and multivariable predictors of ICU mortality.**

Variables	Univariate Model			Multivariate Model		
	OR	CI (95%)	P	OR	CI (95%)	P
<b>Biological</b>						
Sex						
Male	1.0	-	-	1.0	-	-
Female	2.07	1.06–4.03	0.034 <sup>†</sup>	1.69	0.81–3.55	0.162
<b>Clinical</b>						
APACHE II Classification						
< 25 points	1.0	-	-	1.0	-	-
≥ 25 points	4.0	1.98–8.07	0.000 <sup>†</sup>	2.41	1.08–5.37	0.031
SOFA Classification						
< 7 points	1.0	-	-	-	-	-
≥ 7 points	7.76	3.67–16.4	0.000 <sup>†</sup>	-	-	-
Sepsis						
No	1.0	-	-	-	-	-
Yes	3.37	1.64–6.89	0.001 <sup>†</sup>	1.81	0.79–4.12	0.159
Coronary patient						
No	1.0	-	-	-	-	-
Yes	0.69	0.36–1.34	0.270	-	-	-
<b>Laboratory</b>						
NRBC <sup>a</sup>						
Zero	1.0	-	-	1.0	-	-
From 1 a 100	2.21	0.98–4.95	0.055	1.43	0.59–3.47	0.428
> 100	7.20	2.86–18.1	0.000	3.96	1.45–10.8	0.007
CRP <sup>b</sup>	1.015	0.997–1.034	0.100	-	-	-

OR: Odds Ratio. NRBC: nucleated red blood cells. APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II. SOFA: Sequential Organ Failure assessment.

<sup>a</sup> Divided into (0, 1–100, > 100).

<sup>b</sup> Calculated risk of 5 unit increase.

<sup>†</sup>Statistical significance.

doi:10.1371/journal.pone.0144259.t003

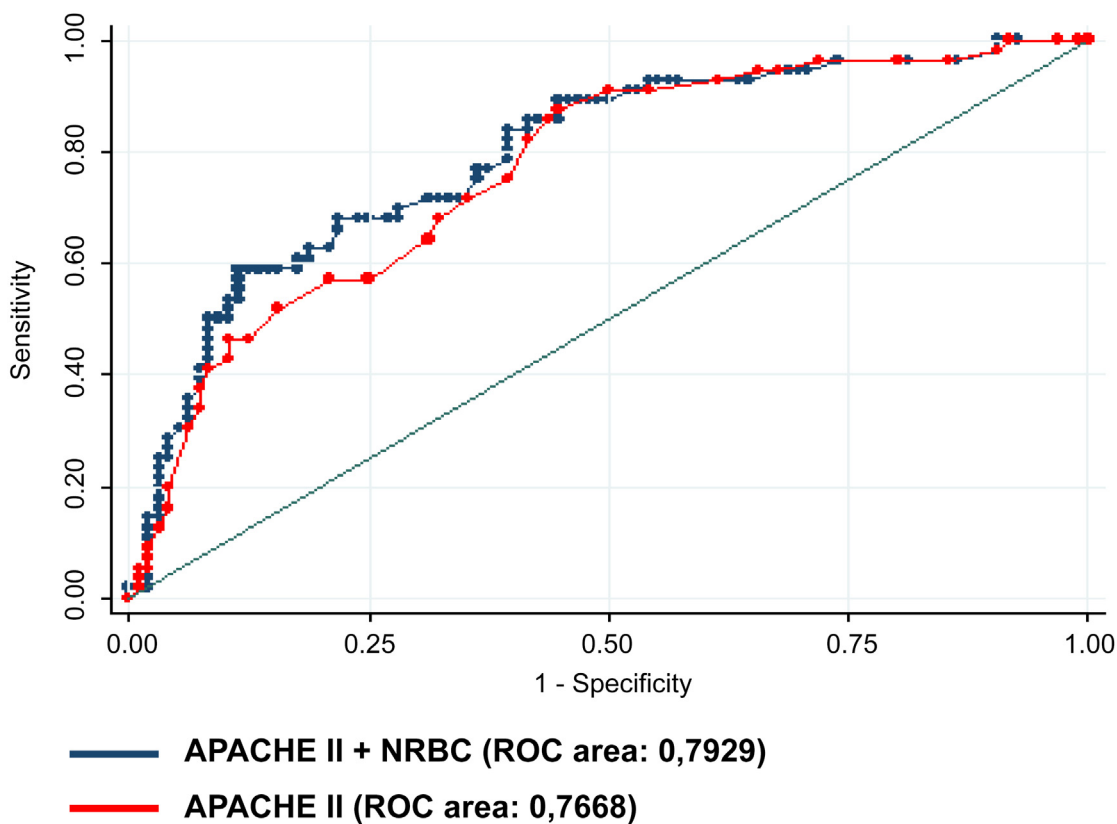


Fig 4. Comparison of ROC curves,  $p = 0.01$ .

doi:10.1371/journal.pone.0144259.g004

higher mortality (adjusted OR 3.24; CI (95%) 1.64–6.38;  $p = 0.001$ ). Possible mechanisms involved in higher mortality among patients with elevated NRBC are hypoxemia and systemic inflammation [1,3,5–7]. Interestingly, our results have a much higher prevalence of NRBC (54.6%) than previous studies such as Stachon et al. [1] (17.5%), Desai et al. [3] (17.5%), Kuert et al. [5] (28.6%), and Shah et al. [7] (24.8%). The higher frequency of the presence of NRBCs in the present study may be explained by the overall higher severity of disease in our population, as expressed by the fact that 63.2% of the patients had an APACHE II score  $\geq 25$ .

When the severity of disease, represented by the APACHE II score, is taken into account, the prevalence of our study closely replicates those previous studies, as in patients with APACHE II score  $\geq 25$ , in whom the majority were NRBC-positive (53%). This concurs with the findings of Stachon et al. [1] and Desai et al. [3]. Moreover, the median SOFA score in this study was 8 in NRBC-positive patients and 3 in those who were NRBC-negative (Table 1). Desai et al. [3] found a median SOFA score of 10 among NRBC-positive and 8 among the NRBC-negative. There would therefore appear to be an association between the presence of NRBCs in the bloodstream and the seriousness of the condition of patients in ICU.

Patients who are candidates for discharge from a general ICU who present with NRBCs should be carefully evaluated, since they have a higher mortality rate [1]. The present study corroborates these findings and suggests a possible new use for measurement of NRBC levels in ICU, since the mortality of NRBC-positive patients discharged from ICU was 61.4%.

Our study must, however, be read within the context of its design. First, we have not split the coronary group into acute and chronic cases, which may have led to bias in analysis of this sub-group and influenced other laboratory variables, such as platelets [16–18]. Second, the

small number of patients in extreme NRBC levels may limit our analysis. However, despite the relatively small sample size, the power for detecting differences in mortality among patients with and without NRBC was 92%. The estimates presented in the study are influenced by random error and from that standpoint may not be dependable.

In conclusion, NRBC predict all-cause mortality in patients admitted to a cardiac ICU. The predictive value of NRBC is independent and complementary to the prediction provided by the well validated APACHE II score.

## Acknowledgments

We would like to thank Paulo Fernando Leite Filho for the computer system, Ulisses Ramos Montarroyos for the statistical analysis and the whole team of the Coronary Unit and Laboratory of PROCAPE, Pernambuco, Brazil.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JGMMJ DOCT RPP DCSF. Performed the experiments: JGMMJ DOCT MCFCS TMBR MLA WJNF EPD AFB. Analyzed the data: JGMMJ DOCT MSB RPP DCSF. Contributed reagents/materials/analysis tools: JGMMJ DOCT MCFCS TMBR. Wrote the paper: JGMMJ DOCT MSB RPP DCSF.

## References

1. Stachon A, Segbers E, Holland-Letz T, Kempf R, Hering S, Krieg M. Nucleated red blood cells in the blood of medical intensive care patients indicate increased mortality risk: a prospective cohort study. *Critical Care* 2007, 11(3): R62. doi: [10.1186/cc5932](https://doi.org/10.1186/cc5932) PMID: [17550592](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17550592/).
2. Stachon A, Holland-Letz T, Krieg M. High in-hospital mortality of intensive care patients with nucleated red blood cells in blood. *Clin Chem Lab Med* 2004, 42(8):933–38. PMID: [15387445](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15387445/).
3. Desai S, Jones SL, Turner KL, Hall J, Moore LJ. Nucleated red blood cells are associated with a higher mortality rate in patients with surgical sepsis. *Surgical Infections* 2012, 13(6):360–5. doi: [10.1089/sur.2011.089](https://doi.org/10.1089/sur.2011.089) PMID: [23237100](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23237100/).
4. Danise P, Maconi M, Barella F, Palma AD, Avino D, Rovetti A, et al. Evaluation of nucleated red blood cells in the peripheral blood of hematological diseases. *Clin Chem Lab Med* 2012, 50(2):357–60. doi: [10.1515/CCLM.2011.766](https://doi.org/10.1515/CCLM.2011.766) PMID: [22022981](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22022981/).
5. Kuert S, Holland-Letz T, Friese J, Stachon A. Association of nucleated red blood cells in blood and arterial oxygen partial tension. *Clin Chem Lab Med* 2011, 49(2):257–63. doi: [10.1515/CCLM.2011.041](https://doi.org/10.1515/CCLM.2011.041) PMID: [21118046](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21118046/).
6. Stachon A, Bolulu O, Holland-Letz T, Krieg M. Association between nucleated red blood cells in blood and levels of erythropoietin, interleukin-3, interleukin-6, and interleukin-12p70. *Shock* 2005, 24(1):34–9. PMID: [15988318](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15988318/).
7. Shah R, Reddy S, Horst M, Stassnopoulos J, Lordan J, Rubinfeld I. Getting back to zero with nucleated red blood cells: following trends is not necessarily a bad thing. *The American Journal of Surgery* 2012 Mar; 203(3): 343–5. doi: [10.1016/j.amjsurg.2011.10.002](https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2011.10.002) PMID: [22244074](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22244074/).
8. Roger HM, Xiaobing Y, Wen J, Smith R, Fibach E, Noguchi CT. Hypoxia Alters Progression of the Erythroid Program. *Experimental Hematology* 2008 Jan; 36(1):17–27. PMID: [17936496](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17936496/).
9. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985 Jan; 13(10):818–29. PMID: [3928249](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3928249/).
10. Vicent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis—Related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996 Jul; 22(7):707–10. PMID: [8844239](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8844239/).
11. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock 2012. *Intensive Care Med* 2013 Feb; 39(2):165–228. doi: [10.1007/s00134-012-2769-8](https://doi.org/10.1007/s00134-012-2769-8) PMID: [23361625](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23361625/).
12. Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without

persistente ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal* 2011 Dec; 32(23):2999–3054. doi: [10.1093/eurheartj/ehr236](https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr236) PMID: [21873419](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21873419/).

13. Fraker TD, Fihn SD, Gibbons RJ, Abrams J, Chatterjee K, Daley J, et al. 2007 Chronic angina focused update of the ACC/AHA 2002 Guidelines for the Management of patients with Chronic Stable Angina: a Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Writing Group to Develop the Focused Update of the 2002 Guidelines for the Management of Patients with Chronic Stable Angina. *Circulation* 2007 Dec 4; 116(23): 2762–72. PMID: [17998462](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17998462/).
14. Nakul-Aquaronne D, Sudaka-Sammarcelli I, Ferrero-Vacher C, Starck B, Bayle J. Evaluation of the Sysmex Xe-2100 hematology analyzer in hospital use. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2003; 17(4): 113–23. PMID: [12784259](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12784259/).
15. Pipitone S, Pavesi F, Testa B, Bardi M, Peri GB, Gennari D, et al. Evaluation of automated nucleated red blood cells counting on Sysmex XE5000 and Siemens ADVIA 2120. *Clin Chem Lab Med* 2012 Oct 1; 50(10):1857–9. doi: [10.1515/cclm-2012-0148](https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0148) PMID: [23089720](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23089720/).
16. Núñez J, Núñez E, Bodí V, Sanchis J, Mainar L, Miñana G, et al. Low lymphocyte count in acute phase of ST-segment elevation myocardial infarction predicts long-term recurrent myocardial infarction. *Coronary Artery Disease* 2010 Jan; 21(1):1–7. PMID: [20050312](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20050312/).
17. Azab B, Zaher M, Weiserbs KF, Torbey E, Lacossiere K, Gaddam S, et al. Usefulness of neutrophil to lymphocyte ratio in predicting short- and long-term mortality after non-ST elevation myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology* 2010 Aug 15; 106(4): 470–6. doi: [10.1016/j.amjcard.2010.03.062](https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2010.03.062) PMID: [20691303](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20691303/).
18. Labriolle AD, Bonello L, Lemesle G, Roy P, Steinberg DH, Xue Z, et al. Decline in platelet count in patients treated by percutaneous coronary intervention: definition, incidence, prognostic importance and predictive factors. *European Heart Journal* 2010 May; 31(9): 1079–87. doi: [10.1093/eurheartj/ehp594](https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp594) PMID: [20089516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20089516/).

## **6. CONCLUSÃO**

Nosso estudo encontrou uma associação independente entre os níveis de NRBCs e a mortalidade na UTI e teve significância estatística com pacientes sépticos. Além disso, foi demonstrado um poder incremental entre os níveis de NRBCs com o escore APACHE II que foram bons indicadores para predição de risco.

## REFERÊNCIAS

- ANGU, S D.C. *et al.* Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*,29:1303-10, 2001.
- BACALL, N.S. Analisador automático hematológico e a importância de validar novos equipamentos em laboratórios clínicos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 31:218-20, 2009.
- BEALE, R.*et al.* PROGRESS Advisory Committee. PROGRESS (Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis): a preliminary report of an internet-based sepsis registry. *Chest*. 2003;124(4 Suppl):224S.
- BRIGGS C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. *International Journal of Laboratory Hematology*, 31:277-97, 2009.
- BROMER, J. S. *et al.* Immunosuppression in pacientes who die of sepsi and multiple organ failure. *Jama*,306(23): 2594-2605, 2011.
- CHONGLIANG, F. *et al.* Development of a prognostic score using the complete blood cell count for surgical prediction in unselected critically ill patients. *Biomed Research Internacional* 2013, 1-4. Epsis an.
- DESAI, S. *et al.* Nucleated red blood cells are associated with a higher mortality rate in patients with surgical sepsis. *Surgical Infections*, 13(6):360-5, 2012.
- HOTCHKISS, R.S.; GUILLAUME, M.; DIDIER, P. Immunosuppression in sepsi: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic appouach. *The Lacet infectious diseases*, 13(3): 260-268, 2013.
- ILAS,20 jul de 2015 Disponível em: <<http://ilas.org.br/ilasorgbr/upfiles/fckeditor/file/>>. Acesso em: 26 de jan. 2016.
- KUERT S, *et al.* Association of nucleated red blood cells in blood and arterial oxygen partial tension. *ClinChem Lab Med*, 49(2):257-263, 2011.
- MARSHALL, J.C.; VINCENT, J.L.; FINK, M.P. Measures markers, and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis. Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, Oct 25-26, 2000. *CritCareMed*, 31:1560-1567.
- MONTEIRO JUNIOR J.G.M.Eritroblasto sérico como biomarcador de gravidade em pacientes admitidos na unidade de terapia intensiva de um hospital cardiológico. 2014. F. Dissertação (Mestrado Ciências da Saúde) - Universidade de Pernambuco intitulado. Mestrado Ciências da Saúde dePernambuco, Recife, 2014.

NAOUM,F.; NAOUM, P.C. Hematologia Laboratorial. Leucócitos. Editora Academia de Ciência e Tecnologia, S.J. Rio Preto, 2006.

NASCIMENTO, M.L.O. Significado dos resultados dos exames do eritrograma após automação laboratorial. Labor News, 155, 2005.

NYDIA S.; BACALL. Analisador automático hematológico e a importância de validar novos equipamentos em laboratórios clínicos. Rev. Bras. Hematol. Hemoter,31(4):218-220, 2009.

PIPITONE S, *et al.* Evaluation of automated nucleated red blood cells counting on Sysmex XE5000 and Siemens ADVIA 2120. ClinChem Lab Med, 50(10):1857 – 1859, 2012.

RUSSEL J.A. Management of sepsis. N Engl J Med. 2006;355:1699-713

SCHAEFER, M, ROWAN R.M. The clinical relevance of nucleated red blood cell counts. Sysmex Journal Internacional 2000 Vol.10(2).

SILVA, E.; PEDRO, M.A.; SOGAYAR, A.C. *et al.* Brazilian sepsi epidemiological study (BASES study). Crit Care 8:(4): 251-260,2004.

SIQUEIRA, B.R.; GOMES A.P.; PESSOA-JÚNIOR V.P, *et al.* Sepse. In: Rocha MOC, Pedroso ERP. Fundamentos em ofsepsis. N Engl J Med. 2003;348(2):138-50. Review.

SIQUEIRA-BATISTA R, GOMES A.P, ALBUQUERQUE V.S, *et al.* Ensino de imunologia na educação médica: lições de Akira Kurosawa. RevBrasEducMed.;33(2):186-90, 2009.

STACHON, A.; SEGBERS,E.; HOLLAND-LETZ, T, *et al.* Nucleated red blood cells in the blood of medical intensive care patients indicate increased mortality risk: a prospective cohort study. Critical care, 11(3):1-8, 2007.

STOVE V. Automated blood cell count 2012:(1-34 pp.). Available from: [http://www.bhs.be/frontend/files/userfiles/files/20112013\\_Educational\\_Courses/Seminar\\_1-Stove-Presentation.pdf](http://www.bhs.be/frontend/files/userfiles/files/20112013_Educational_Courses/Seminar_1-Stove-Presentation.pdf).

TAKALA, A.; NUPPONEN, I.; KYLANPAA-BACK, M.L. *et al.* Markers of inflammation in sepsis. Ann Med, 34:614-623,2002. XE-5000 Sistema Automatizado para Hematologia 2010. Disponível em: <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/XE-5000>> Acesso em: 10 nov.2016

**ANEXO 01****Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

## 1. Dados do participante:

Nome:

---

RG: \_\_\_\_\_ CPF: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Sexo: ( ) Masculino ( ) Feminino

Endereço:

---

nº: \_\_\_\_

Complemento:

---

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_ Telefone/Operadora: (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

## 2. Título do Protocolo de Pesquisa:

**ESCORES CLÍNICOS E BIOMARCADORES ASSOCIADOS À MORTALIDADE EM  
PACIENTES ADMITIDOS NA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA DE UM  
HOSPITAL CARDIOLÓGICO**

## 3. Dados do Investigador Principal:

Investigador Principal: Prof. Dr. Dário Celestino Sobral Filho – CRM \_\_\_\_\_ - Médico  
Cardiologista

Unidade: Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE)

Comitê de Ética em Pesquisa:

Dados para contato:

Fone:

4. Avaliação do Risco da Pesquisa:

( ) Risco mínimo ( X ) Risco baixo ( ) Risco médio ( ) Risco maior

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

5. Duração da Pesquisa:

3 anos.

Termo de consentimento livre e esclarecido conforme as diretrizes da resolução CNS 196/96 para projeto: **Escores clínicos e biomarcadores associados à mortalidade em pacientes admitidos na unidade de terapia intensiva de um hospital cardiológico.**

O estudo intitulado **“Escores clínicos e biomarcadores associados à mortalidade em pacientes admitidos na unidade de terapia intensiva de um hospital cardiológico”**, sob a responsabilidade de Dr. Dário Celestino Sobral Filho, a ser realizado no Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) – Unidade Coronária I (UCO I), tem como objetivo verificar a associação entre fatores de risco com a mortalidade em pacientes admitidos na unidade coronária I .

**Você foi convidado a participar desse estudo por ser admitido na UCO I do PROCAPE, caso concorde em participar, sua colaboração no estudo consistirá nas seguintes etapas:**

1- Como protocolo da UCO I, exames laboratoriais são solicitados diariamente para a sua monitorização durante o período de internação. Nas primeiras 24 horas de admissão na UCO I amostras de seu sangue venoso, 10 mL, serão coletadas como de rotina para exames laboratoriais, utilizaremos estas amostras para a dosagem de procalcitonina, proteína C reativa ultrasensível, Interleucina (IL)-3, IL-6, IL-8, IL-10 e

polimorfismo das interleucinas (IL-3, IL-6, IL-8, IL-10). Os resultados dos seus exames de NRBCs, eosinófilos, plaquetas, leucócitos, creatinina, bilirrubinas, alanina aminotransferase, sódio, potássio, gasometria e tempo de protrombina serão compilados dos exames laboratoriais de rotina para o seu acompanhamento diário.

2- Seu prontuário hospitalar será consultado para avaliar a sua pontuação do escore *Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II* (APACHE II) e escore *Sepsis Related Organ Failure Assessment* (SOFA), modelos de risco de gravidade da doença utilizados na UCO I.

3- O projeto não fornece benefício ou compensação financeira para a sua participação no estudo.

4- Se você concordar, sua amostra de sangue poderá ser guardada e poderá ser utilizada em estudos futuros desde que aprovados por Comitê de Ética em Pesquisa. O armazenamento das amostras de forma organizada e com informações associadas dos pacientes conforme recomendações e/ou normas técnicas estarão sob a responsabilidade da Biomédica Maria Cleide Freire, gerente do laboratório do PROCAPE, a qual tem treinamentos em pesquisa clínica. O referido laboratório tem uma infra-estrutura com dois freezers a  $-80^{\circ}\text{C}$  para este fim.

### **Riscos:**

1- Existe um pequeno risco nas coletas de sangue como a formação de um hematoma e dor. As coletas de sangue serão feitas por profissional treinado. O Hospital lhe dará a mesma assistência caso isto ocorra com você.

Técnica de punção venosa e arterial: inicialmente, deve-se explicar todo o procedimento ao paciente, seguindo-se da colocação do torniquete na porção proximal do braço para facilitar a visibilização da veia a ser puncionada. Segue-se com a assepsia rigorosa do sítio de punção realizada com soluções degermantes a base de clorexidina, polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I) ou com álcool a 70%. A utilização de luvas e máscara é obrigatória. Então, realiza-se a punção venosa ou arterial com agulha e seringa descartáveis para colheita do sangue para exames laboratoriais e em seguida, nova assepsia e compressa local. Quanto às possíveis

complicações podemos ter: formação de hematomas, trombose venosa e tromboflebites. Para cada complicação, deve-se proceder à sua resolução imediata.

Técnica líquido cefalorraquidiano (LCR): A coleta de LCR será feita por meio de uma punção, em ambiente hospitalar, que pode ser suboccipital (logo abaixo do crânio) ou lombar (entre a terceira, a quarta e a quinta vértebra lombares) é imprescindível que o procedimento seja totalmente estéril e realizado por um profissional treinado. Por conseguinte a coleta, o paciente deve permanecer em repouso por, no mínimo, 12 horas e hidratação forçada. Quanto às possíveis complicações podemos ter: sangramento, cefaléia e lombalgia. Para cada complicação, deve-se proceder à sua resolução imediata.

2- Você tem a garantia que suas informações pessoais serão mantidas em sigilo e que manteremos os resultados deste estudo confidencial. Tanto o questionário quanto as amostras serão identificados por número código e não por seu nome.

### **Benefícios:**

Você não é obrigado a participar deste estudo e a qualquer momento você poderá tirar a sua permissão de participação. O projeto não lhe fornecerá nenhum benefício pessoal ou compensação financeira por sua participação. Participando, você contribuirá para o melhor entendimento sobre biomarcadores que indiquem o prognóstico dos pacientes de UTI, como a gravidade da doença, presença de infecção ou resposta inflamatória sistêmica, a fim de se obter alternativas terapêuticas precoces, mais seletivas e menos danosas para os pacientes. Se, a qualquer momento, você retirar sua permissão de participação no estudo, suas amostras de sangue serão descartadas.

Então, o projeto em pauta pretende capacitar recursos humanos e contribuir com as políticas de saúde, ciência e tecnologia brasileira através da identificação de biomarcadores relevantes para a saúde.

### **Esclarecimentos:**

Você tem a garantia de qualquer esclarecimento, pelos pesquisadores responsáveis, antes e durante o curso da pesquisa.

Nosso estudo não resultará em despesas para a instituição ou para o paciente e familiar, será realizado utilizando o prontuário do paciente para a retirada de dados demográficos e clínicos gerais do pacientes. As dosagens laboratoriais utilizadas são de rotina do laboratório e faz parte do protocolo de avaliação dos pacientes de UTI do PROCAPE, convênio SUS. Eventuais despesas extras serão de responsabilidade do pesquisador.

**Consentimento para guarda da amostra de sangue e uso em estudo futuro:**

**Sua amostra de sangue poderá ser guardada e poderá ser utilizada em outros estudos futuros se aprovados por Comitê de Ética em Pesquisa**

**\*Assinale apenas uma das alternativas abaixo:**

**Sim, eu permito que minha amostra seja guardada para possível utilização em outros estudos, se aprovado pela Comissão de Ética e eu não preciso ser contatado na ocasião.**

**Sim, eu permito que minha amostra seja guardada para possível utilização em outros estudos, se aprovado pela Comissão de Ética, mas eu quero ser contatado na ocasião para novo consentimento. Número de telefone para contato: ( ) \_\_\_\_\_**

**Não, eu não permito que minha amostra seja guardada para possível utilização em outros estudos.**

**DECLARO QUE LI E ENTENDI TODAS AS INFORMAÇÕES E CONCORDO NA MINHA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA ACIMA. TENHO LIBERDADE DE RETIRAR O MEU CONSENTIMENTO EM QUALQUER FASE DA PESQUISA, CASO NÃO QUEIRA CONTINUAR PARTICIPANDO DA MESMA, SEM PREJUÍZO ALGUM.**

**Nome do participante:**

---

**Assinatura:**

---

**Data:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

SE VOCÊ NÃO ESTIVER EM CONDIÇÕES FÍSICAS OU MENTAIS DE DECIDIR SOBRE SUA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO, SEU REPRESENTANTE LEGAL PODERÁ ASSINAR ESTE TERMO.

**Nome do representante legal:**

---

**Assinatura:**

---

**Data:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Dário Sobral, Médico, PhD, Pesquisador Responsável**

## ANEXO 2

### Escore *Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II* (APACHE II)

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ anos Leito: \_\_\_\_\_

Prontuário: \_\_\_\_\_ Data de admissão: \_\_\_\_\_

#### 1 - Variáveis fisiológicas e laboratoriais coletadas nas primeiras 24 h

	+4	+3	+2	+1	0	+1	+2	+3	+4
Temperatura (graus Celsius)	≥41	39-40,9		38,5-38,9	36-38,4	34-35,9	32-33,9	30-31,9	≤29,9
Pressão arterial média (mmHg)	≥160	130-159	110-129		70-109		50-69		≤49
Frequência cardíaca (bpm )	≥180	140-179	110-139		70-109		55-69	40-54	≤39
Frequência respiratória (rpm )	≥50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		≤5
( A-a ) com FiO <sub>2</sub> ≥ 0,5	>500	350-499	200-349		≤200				
PO <sub>2</sub> com FiO <sub>2</sub> < 0,5					>70	61-70		55-60	≤55
pH arterial	≥7,7	7,6-7,69		7,5-7,59	7,3-7,49		7,25-7,3	7,15-7,2	<7,15
Sódio sérico (mEq/L)	≥180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	≤110
Potássio sérico (mEq/L)	≥7	6-6,9		5,5-5,9	3,5-5,4	3-3,4	2,5-2,9		≤2,5
Creatinina sérica (mg%)	≥3,5	2-3,4	1,5-1,9		0,6-1,4		<0,6		
Hematócrito (%)	≥60		50-59,9	46-49,9	30-45,9		20-29,9		≤20
Leucócitos ( X 1000 mm <sup>3</sup>	≥40		20-39,9	15-19,9	3-14,9		1-2,9		≤1

#### 2 - Escala de Glasgow

3 - Idade (anos ): ≤44:0 ; 45-54:2 ; 55-64:3 ; 65-74:5 ; ≥75:6

4 - Doenças crônicas: clínico: 5; cirúrgico de urgência: 5 ; cirúrgico eletivo:2

TOTAL DE PONTOS: \_\_\_\_\_ 0-4: 4% NÃO-OP., 1% PÓS-OP / 5-9:8%, 3% / 10-14: 15%, 7% / 15-19: 24%,12% 20-24: 40%, 30% / 25-29: 55%, 35% / 30-34: 73%, 73%/35-100: 85%, 88%.

### ANEXO 3

#### *Sepsis Related Organ Failure Assessment (SOFA)*

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ anos Leito: \_\_\_\_\_

Prontuário: \_\_\_\_\_ Data de admissão: \_\_\_\_\_

1 - Variáveis fisiológicas e laboratoriais coletadas no primeiro, segundo, terceiro, quinto, sétimo, 14° e 28° dia de internação.

<b>PONTUAÇÃO</b> <b>VARIÁVEL</b>	0	1	2	3	4
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	> 400	≤ 400	≤ 300	≤200±VM	≤100±VM
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> )	> 150	≤ 150	≤ 100	≤50	≤20
Bilirrubinas (mg%)	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 5,9	6,0 – 11,9	>12
Cardiovascular	PAM Normal	PAM < 70	Dopa < 5 e/ou Dobutamina	Dopa > 5 Epi ≤ 0,1 Nor ≤ 0,1	Dopa > 15 Epi > 0,1 Nor > 0,1
Escala de Glasgow	15	13 – 14	10 – 12	6 – 9	< 6
Creatinina (mg%) ou Diurese (mL/dia)	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 3,4	3,5 – 4,9 ou <500	>5,0 Ou <200

Fonte: Modificado de Vincent e cols. (1996)

Dopa = Dopamina (µg/Kg/min); Epi = Epinefrina (µg/Kg/min); Nor = Noradrenalina (µg/Kg/min)

PAM = Pressão Arterial Média; PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> = Pressão Arterial de Oxigênio/Fração Inspirada de Oxigênio; VM = Ventilação Mecânica.

**ANEXO4****DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS**

Eu, Marilene Leite Alves, portadora do documento de identidade RG 6276808-PE, CPFn° 030.140.174-85, aluna regularmente matriculada no curso de Pós-Graduação em Hematologia e Hemoterapia Laboratorial, do programa de *Lato Sensu* da INESP – INSTITUTO NACIONAL DE ENSINO SUPERIOR E PESQUISA, sob o n° HC1402519 declaro a quem possa interessar e para todos os fins de direito, que:

1. Sou a legítima autora da monografia cujo título é: “”, da qual esta declaração faz parte, em seus ANEXOS;
2. Respeitei a legislação vigente sobre direitos autorais, em especial, citado sempre as fontes as quais recorri para transcrever ou adaptar textos produzidos por terceiros, conforme as normas técnicas em vigor.

Declaro-me, ainda, ciente de que se for apurado a qualquer tempo qualquer falsidade quanto às declarações 1 e 2, acima, este meu trabalho monográfico poderá ser considerado NULO e, conseqüentemente, o certificado de conclusão de curso/diploma correspondente ao curso para o qual entreguei esta monografia será cancelado, podendo toda e qualquer informação a respeito desse fato vir a tornar-se de conhecimento público.

Por ser expressão da verdade, dato e assino a presente DECLARAÇÃO,

Em Recife, \_\_\_\_/\_\_\_\_ de 2016.

---

Assinatura do (a) aluno (a)

Autenticação dessa assinatura, pelo  
funcionário da Secretaria da Pós-  
Graduação *Lato Sensu*